

## 河鲀 I 型胶原蛋白提取物的医药保健用途及其制备工艺

### 技术领域

本发明涉及河鲀 I 型胶原蛋白提取物作为有效成分在制备治疗和预防如下疾病的药物和保健食品中的应用，河鲀 I 型胶原蛋白提取物的主要化学成分和活性成分为河鲀天然未变性 I 型胶原蛋白或河鲀变性 I 型胶原蛋白及其部分水解物，本发明还涉及所述河鲀 I 型胶原蛋白提取物的制备工艺、免疫学测定方法及其作为有效成分在治疗和保健中的用途。

### 背景技术

按照鱼类分类学，本发明所用“河鲀”为硬骨鱼纲，属鲀形目 (Tetradontiformes) 鲀科 (Tetraodontidae)，河鲀也叫气泡鱼 (pufferfish, Swellfish, Balloonfish, Blowfish)。但是时至今日，因各种历史原因和习俗，河鲀常被误称为河豚（日本也写为河豚），并一直沿用下来，而实际上“河豚”为水生哺乳类，属鲸目 (Cetacea)、河豚科 (Platanistidae)。

### 关于河鲀毒素来源与河鲀的毒性：

河鲀有毒，但是，河鲀毒素并非河鲀自身产生的，即河鲀不会自己合成河鲀毒素。河鲀属回游生物，在每年 4 至 6 月的排卵期，它们从海洋游入内陆江河，产卵后又游回大海，河鲀幼鱼也在当年游入海洋。实际上，河鲀毒素是由寄生于河鲀体内的数种海洋微生物产生的，这些海洋微生物不存在于江河湖泊的淡水环境中，它们寄生于海洋中的河鲀后合成并将河鲀毒素分泌屯集于河鲀体内。另有实验证实，河鲀毒素源于河鲀摄食了产生河鲀毒

素的海洋生物。英国、日本等多个实验室在这方面做了许多研究工作，发现在人工或无具毒海洋生物的自然海水中繁育饲养的河鲀均无河鲀毒素毒性。进一步研究证实，河鲀自身基因组及细胞内没有河鲀毒素生物合成所必需的基因族和合成酶类。

#### 关于胶原蛋白的生理生化和药理学：

目前已发现了二十多种胶原蛋白，都具有三股螺旋结构或部分三股螺旋结构。一般认为，它们作为细胞外基质的主要成分，起支撑，连接，保护和构成的作用，是人体内含量最高的蛋白质，几乎分布于所有器官和组织。但是，由于胶原族蛋白分子巨大、种类繁多和结构复杂，迄今我们对胶原族蛋白质的生理生化、生物学功能和病理学意义尚未完全了解。

#### 胶原 (collagen)：

胶原的化学本质是蛋白质，由十几种氨基酸按一定排列顺序组成的胶原亚基（如 $\alpha$ 、 $\beta$ 肽链等）是构成胶原分子的亚单位。胶原分子由三条螺旋型的肽链互相盘绕而成。每条肽链约由 1000 个氨基酸组成，肽链和肽链之间，由氢键联结来加以稳定，也有少量共价交连。胶原不溶于水，就是由这个紧密、坚固的三螺旋体结构决定的。当胶原受热变性或水解时，这个三链螺旋结构松散开来，转变成明胶分子的无序和不规则线团状结构，同时水溶性也大大提高。

#### 明胶 (gelatin)：

胶原经过不可逆的变性作用和部分降解断裂所产生的产物称为明胶。即明胶是胶原的变性和部分降解产物，由已失去原特定空间构型的无序胶原亚基肽链及其部分水解产物胶原多肽组成。但是胶原制品和明胶制品的主要化学成分是相同的，即都是胶原性蛋白质。

### I型胶原 (*type I collagen*)

已有大量研究文献证实，皮肤和骨骼中的蛋白质主要是胶原蛋白。皮肤中存在的主要是I型胶原和极少量III型胶原，它们占皮肤蛋白的90%左右。III型胶原主要存在于胚胎皮肤中，出生后在皮肤中的含量不断减少降低并稳定在一个很低的水平。皮肤中的III型胶原含量增多主要出现在局部愈伤疤痕组织中。硬骨中主要是I型胶原蛋白，软骨中主要是II型胶原蛋白，它们占骨骼蛋白的90%以上。由于皮肤和骨骼来源广泛易得，因此，皮肤和骨骼是提取制备I型胶原蛋白的最佳原料，这一点已为本领域专业技术人员熟知且广泛应用。也是本发明的主要理论依据 (① Miller, E. J. et al., in: *Methods in Enzymol.*, vol. 82, Academic Press; ② Ven Der Rest, M., et al. Collagen family of proteins. *FASEB J.*, 1991, 5: 2814 – 2823.)。在日本 Nagai, T. 等人的文献: Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food chemistry*, 2002, 78: 173–177. 中也明确指出，弓斑东方鲀皮肤的胶原主要是I型胶原，且三螺旋亚基组成是 $[\alpha_1(I), \alpha_2(I)]$ 。

口服动物胶（阿胶、龟甲胶、黄鱼鳔胶）可调节、增强机体免疫功能，增强机体抵抗力，这早已为大众所知，但是药理作用机制不清楚。这些动物胶的化学本质为变性胶原蛋白及其部分水解产物。

胶原蛋白应用于医疗保健的另一重要制剂来自鲨鱼软骨胶原（II型胶原）。国际专利申请公开 WO 95/32722 和 WO 96/23512 等公开了鲨鱼软骨胶原提取物制备方法及其医疗用途，涉及鲨鱼软骨胶原提取物抗基质金属蛋白酶、抗新血管生成和抗肿瘤活性。

因此，胶原蛋白除具有支撑，连接，保护和构成的作用外，

还有其它我们现在尚不了解的重要功能和作用机制。

### 关于河鲀胶和明胶的制造工艺与用途:

明胶包括河鲀胶（即河鲀鱼皮明胶）的工业制造工艺技术主要有酸法、碱法和酶法技术，其生产过程一般包括以下主要工艺步骤：I、原料的前处理，包括：①.预处理：包括预检；分类；漂洗；切块和脱脂。②除杂质和软化膨胀：主要有酸、碱（石灰乳浸）和酶处理三种方法。II、明胶的提取：熬胶。即制胶原料用水加热提取明胶。III、胶液的处理：包括过滤、浓缩、防腐和干燥成形，最后得到薄片状、粉末状或颗粒状明胶。

现有文献大量报道了分离纯化制备 I 型胶原的实验室方法，但是这些方法工艺复杂，流程长，产率低，条件苛刻(10℃以下)，有残留试剂，药理学与生物学活性不明，安全性也不能保证，且不宜进行工业化大生产。[Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods in Enzymol.*, vol. 82、vol. 144, Academic Press Inc.]。如上述日本 Nagai, T. 等人的文献报道了弓斑东方鲀皮肤 I 型胶原蛋白的提取，方法是：将河鲀鱼皮先用 0.1 mol/L NaOH 在 4℃处理除去非胶原蛋白和色素，冻干后用 10%正丁醇脱脂 2 天，再冻干。然后用 0.5 mol/L 醋酸提取 3 天，提取物于 20,000 × g 离心 1 小时，离心上清液于 0.7 mol/L NaCl 盐析后，继续于 pH7.5 条件下加 NaCl 到 2.5 mol/L 终浓度盐析，离心，透析脱盐，冻干得酸溶性胶原(ASC)，ASC 相对于原料干重的得率为 10.7%；离心沉淀重新混悬于 0.5 mol/L 醋酸后，用大量胃蛋白酶水解消化（酶用量为 10%，重量体积比 w/v）48 小时，离心，离心上清液透析 3 天，再次离心，沉淀复溶于 0.5 mol/L 醋酸后于 0.7 mol/L NaCl 盐析，离心，离心上清液于 pH7.5 条件下加 NaCl 到 2.2 mol/L 终浓度盐析，离心，沉淀复溶于 0.5 mol/L 醋酸后，

透析脱盐，冻干得胃蛋白酶可溶性胶原（PSC），PSC 相对于原料干重得率为 44.7%。用 CM-Toyopearl 650M 离子交换柱纯化产物，经 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示，ASC 和 PSC 为弓斑东方鲀 I 型胶原蛋白。上述提取过程均在 4℃ 条件下进行。可见该方法非常复杂、步骤太多、设备条件要求高，又极为耗时，全部过程最低需要 20 天以上。

河鲀鱼皮（鱼骨）由于有毒性（天然河鲀鱼皮、鱼骨含有中等程度的河鲀毒素），大多不作食用，一般用于医药和工业用明胶制造以及皮革加工制造，例如用作止血海绵、可吸收缝合线、美容等，但是，从未有过用于本发明所述的医药保健用途。本发明的制备方法与现有技术（李晓川等：《河鲀鱼及其加工利用》，147~149 页，中国农业出版社，1998）相比也具有诸多优点。

#### 关于相关疾病的病理生理学和药理学：

胃溃疡在人群中的发病率为 8~10%，属多发性常见慢性病。虽然消化性胃溃疡的病理学机制尚未完全了解，但是目前已经认识到下述三种主要的致病因素：(1) 胃壁细胞分泌盐酸过多；(2) 胃粘膜防御机能不全或受损和(3) 幽门螺杆菌感染。对应地，临床治疗消化性溃疡药物也主要有 3 类。但是它们的作用单一且副作用较多。所以，研究开发高效、速效、长效和副作用少的胃溃疡治疗药物是世界各大制药公司极其重视的项目和目标。

全球药物滥用之首当属酒精滥用（酗酒及摄入过多），其后果非常严重且难以控制。酒精滥用是酒精性胃溃疡、胃出血和酒精性肝纤维化（可演化为肝硬化）等疾病的主要病因。乙醇和许多药物及化学品可诱发肝纤维化或肝硬化，肝硬化可进一步发展引起肝癌。所以研究开发（饮酒前和饮酒后）治疗与预防酒精性疾病高效速效低毒药物成为必要。

研究表明，类风湿性关节炎、风湿性关节炎和红斑狼疮是由于机体免疫功能失调与紊乱引起，并与（Ⅱ型）胶原代谢相关。

临床化疗的最大问题之一是化疗后的副作用（如严重胃肠道反应，体重下降，免疫力下降和白细胞减少等），往往给患者造成巨大的生理和心理伤害，这种伤害有时甚至会超过肿瘤本身造成的伤害。因此，升高白细胞数，增强机体免疫力和改善胃肠道功能药物和保健品的应用是克服化疗副作用，提高化疗效果的另一有效途径。

本发明正是基于上述背景和需求而产生的。

## 发明内容

本发明的目的是提供河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物作为有效成分在制备治疗和预防如下疾病的药物和保健食品中的应用，河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物的主要化学成分和活性成分为河鲀天然未变性Ⅰ型胶原蛋白或河鲀变性Ⅰ型胶原蛋白及其部分水解物，本发明还涉及所述河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物的制备工艺、免疫学测定方法及其作为有效成分在治疗和保健中的用途。

本发明的河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物的药理学作用：

经我们对本发明的河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物药效学和药理学的大量动物试验研究，发现河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物具有多种药理作用和生物活性。其中一些试验如下，由此对本发明的河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物的药理作用和药效学得出如下重要结论：

(1). 河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对无水乙醇诱发的大鼠胃溃疡和胃粘膜损伤有极显著保护作用。

(2). 河鲀Ⅰ型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对 Shay 大鼠胃溃疡有极显著预防作用。说明其对消化性胃溃疡有显著预防治疗作

用。

(3). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对大鼠醋酸灼伤型胃溃疡有极显著治疗作用。说明河鮀 I 型胶原蛋白提取物对慢性胃溃疡有治疗作用，可显著促进溃疡部位的愈合。

(4). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对利血平诱发的小鼠胃溃疡有极显著预防治疗作用。说明其对脾虚性胃溃疡有显著预防治疗作用。

(5). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖对吲哚美辛诱发的大鼠胃溃疡有极显著预防治疗作用。说明其对非甾体抗炎药引起的胃粘膜损伤溃疡有显著预防治疗作用。

(6). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对大鼠四氯化碳和无水乙醇急性肝损伤引起的血浆转氨酶升高有极显著降低作用。

(7). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物对 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 和醋酸诱发的大鼠结肠炎，及其引起的腹泻具有显著治疗作用，并可升高由于结肠炎引起的体重下降。

(8). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性升高环磷酰胺诱发的小鼠血液白细胞数下降。说明其可增强机体免疫力，降低化疗药物副作用。

(9). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性抑制酒精性脂肪肝大鼠肝脏和胃壁层胶原蛋白含量的病理性升高。表明河鮀 I 型胶原蛋白提取物可抑制胶原蛋白在肝脏和胃中的病理性合成，预防与治疗肝纤维化。

(10). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物在给药后 30 分钟即达最大药效的 96.81%，说明河鮀 I 型胶原蛋白提取物起效迅速。而且其在给药后 18 小时仍保持最大药效的 77.78%，说明河鮀 I 型胶原

蛋白提取物具有长效性。

(11). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对小鼠胃排空和溴吡斯地明促进胃排空作用有极显著抑制作用。说明河鮀 I 型胶原蛋白提取物可阻断乙酰胆碱的作用，抑制乙酰胆碱对胃平滑肌的收缩刺激抑制胃痉挛。延长食物在胃肠道中的滞留时间，促进食物的消化吸收。

(12). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物可显著升高吲哚美辛引起的胃粘膜前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、前列环素 - 6-K 水平降低，揭示河鮀 I 型胶原蛋白提取物保护、维持胃粘膜 PGE<sub>2</sub> 水平和胃粘膜血流量，是其抗溃疡作用和胃粘膜细胞保护重要机制之一。河鮀 I 型胶原蛋白提取物还可显著促进胃粘膜粘液 (mulin) 的分泌。

(13). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对组胺、乙酰胆碱刺激的大鼠胃酸分泌有极显著抑制作用，而且对基础胃酸分泌也有显著抑制作用。说明河鮀 I 型胶原蛋白提取物对组胺、乙酰胆碱的阻滞作用是其抗消化性胃溃疡作用重要机制之一。

(14). Beagle 犬等的毒理学试验表明河鮀 I 型胶原蛋白提取物高度安全。可长期口服，安全有效。大剂量服用可增加机体体重，增加机体免疫器官重量，提高机体免疫力。

(15). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物对巯基乙胺、醋酸和盐酸组胺 / 吲哚美辛诱发的大鼠十二指肠溃疡有极显著的预防和治疗作用。

(16). 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对 Shay 大鼠血清胃泌素水平升高有显著抑制作用。揭示河鮀 I 型胶原蛋白提取物可抑制胃泌素刺激的胃酸分泌，是其抗消化性胃溃疡作用的重要机制之一。

(17). 一方面，河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性极显著降低乙醇损伤大鼠胃粘膜中 NO 水平、iNOS 活力以及 iNOS 基因表

达水平，并使 NO 含量和 iNOS 活力极显著降低至正常水平以下。同时另一方面，河鲀 I 型胶原蛋白提取物极显著升高乙醇诱发的 cNOS 基因表达水平下降，并恢复至正常水平。表明河鲀 I 型胶原蛋白提取物对胃粘膜 NO 水平、iNOS 活力、iNOS 和 cNOS 基因表达的差别调节，是其胃粘膜保护、舒张血管、改善胃粘膜血流量、预防和治疗胃溃疡的重要机制之一。

(18). 河鲀 I 型胶原蛋白提取物可显著抑制鸡胚新生血管的发生。

(19). 河鲀 I 型胶原蛋白提取物具有体外显著缩短凝血酶原时间 (PT)、血浆凝血酶时间 (TT)、血浆活化部分凝血活酶时间 (APTT) 的作用。

(20). 河鲀 I 型胶原蛋白提取物体外对猪和兔的  $H^+, K^+$ -ATPase 具有一定抑制作用。

基于上述发现，本发明得出以下结论：河鲀 I 型胶原蛋白提取物作为有效成分可用于治疗和预防下列疾病：胃肠道疾病，如胃溃疡、酒精性与药物性胃溃疡和胃出血、酒精性与药物性胃粘膜损伤、应激性胃溃疡、急慢性胃炎、浅表性与糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、十二指肠溃疡、肠易激综合症、结肠炎、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良及其引起的体重下降、腹胀、腹泻；肝细胞损伤与胶原增生性疾病，如酒精性肝损伤及其引起的肝纤维化和肝硬化、肝纤维化、肝硬化、药物性肝损伤及其引起的肝纤维化和肝硬化、肾纤维化、心肌纤维化；免疫性疾病，如免疫功能失调和下降、白细胞减少症、类风湿性关节炎、风湿性关节炎、红斑狼疮；肿瘤，如消化道恶性肿瘤发生、发展和转移、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、其它实体

恶性肿瘤发生、发展和转移、新生血管生成性疾病。

迄今，国内外尚无任何动物试验研究和临床应用报道河鲀胶、河鲀 I 型胶原蛋白具有如本发明所述的医药保健用途的生物活性、药理作用及其作用机制。本发明人首次发现了河鲀 I 型胶原蛋白提取物的这些药理学活性，从而完成了本发明。

本发明还提供了一种用河鲀鱼皮和/或包括鱼鳍在内的河鲀鱼骨制备河鲀 I 型胶原蛋白提取物的方法，它包括以下步骤：

(1) 原料预处理：

a. 天然河鲀鱼皮、鱼骨原料的脱毒预处理：在 0℃ ~ 50℃，用酸液或碱液处理 4 小时 ~ 48 小时，充分水洗，如此重复 4 至 6 次；

使用碱液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，碱液终浓度为 0.01 ~ 0.1 mol/L，20℃ ~ 30℃，脱毒 8 小时 ~ 24 小时，重复 4 ~ 5 次；使用酸液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，酸液终浓度为 0.1 ~ 0.2 mol/L，0℃ ~ 20℃，脱毒 6 小时 ~ 24 小时，重复 4 ~ 5 次；

b. 用水将人工繁育淡水饲养的河鲀鱼皮、鱼骨原料或脱毒后的天然河鲀鱼皮、鱼骨原料洗净，如暂时不用，可于 -20℃ 以下长期冷冻保存备用；

(2) 提取，按上述三种提取方法之一进行：

a. 向预处理后的河鲀鱼皮、鱼骨为任意比例的原料中加入水或酸液，在 0℃ ~ 125℃，常压 ~ 3 个大气压下，提取 60 分钟 ~ 100 小时，滤取液态部分，如此重复 0 ~ 6 次，合并滤液，将残渣加水或与滤液合并粉碎匀浆得匀浆液，以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在 20℃ 以下放置 12 ~ 48 小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压，0℃～10℃，酸液反应终浓度范围是0.1～0.5 mol/L，提取48～72小时，重复2～4次，匀浆；以及常压，40℃～80℃，酸液反应终浓度范围是0.01～0.2 mol/L，提取4小时～8小时，重复3～5次，匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压，90℃～100℃，提取3小时～8小时，重复1～3次，匀浆；

b. 向预处理后的河鲀鱼骨原料加入水或酸液，在0℃～125℃，常压～3个大气压下，提取60分钟～100小时，滤取液态部分，如此重复0～6次，合并滤液，弃去残渣，将滤液浓缩至原体积的100%～10%后，加入适量河鲀鱼皮原料，在0℃～125℃，常压至3个大气压下，提取60分钟～100小时，滤取液态部分，再加水或同样的酸液提取，如此重复0～6次，合并滤液，将残渣与滤液合并后粉碎匀浆得匀浆液。以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在20℃以下放置12～48小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压，0℃～10℃，酸液反应终浓度范围是0.1～0.5 mol/L，提取48～72小时，重复2～4次，匀浆；以及常压，40℃～80℃，酸液反应终浓度范围是0.01～0.2 mol/L，提取4小时～8小时，重复3～5次，匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压，90℃～100℃，提取3小时～8小时，重复1～3次，匀浆；

c. 也可以按现有I型胶原蛋白和明胶常规提取方法或修改的方法制备获得本发明的河鲀I型胶原蛋白提取物；如将预处理后的河鲀鱼皮、鱼骨为任意比例的原料用稀碱、稀酸或蛋白水解酶

处理 24 小时以上除去杂蛋白后，水洗，脱脂，在 10℃以下用稀酸如 0.1~0.5mol/L 醋酸或盐酸等反复抽提后，匀浆，离心，将离心上清液、稀酸抽提液中和或不中和，用 0.7~4.4mol/L 终浓度的中性盐如氯化钠逐级、反复盐析得 I 型胶原沉淀物；或在 10℃以下用中性盐如氯化钠稀溶液反复抽提，离心或过滤得 I 型胶原提取液；或用沸水反复抽提，离心或过滤得变性 I 型胶原蛋白提取液。抽提后的残渣用蛋白酶如胃蛋白酶水解处理，再行上述盐析得河鮀 I 型胶原蛋白。提取的 I 型胶原蛋白溶液用 DEAE- 或 CM- 离子交换剂纯化除去杂蛋白即得河鮀 I 型胶原蛋白，但是，应用现有河鮀 I 型胶原蛋白提取方法（见 Nagai, T. 的文献方法）提取本发明的河鮀 I 型胶原蛋白提取物，生产周期长，能耗大，不宜进行大规模工业化生产，产物的药理学活性不高且随工艺条件不同有波动，并有三废产生；

(3) 过滤浓缩：

匀浆液经离心或过滤去渣，可选择地，将滤液进行浓缩，可浓缩至原体积的 100%~10%，得河鮀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液，

其中使用酸液低温提取时，较为优选的去渣方法是低温高速离心；使用水或酸液高温提取时，较为优选的去渣方法是过滤；

使用酸液低温提取时，较为优选的浓缩方法是应用 100~200Kda 孔径超滤膜超滤浓缩；使用水或酸液高温提取时，较为优选的浓缩方法是减压真空浓缩；

优选的简便制备方法是在上述提取液离心或过滤去渣后，直接进行（超滤）浓缩、（冷冻、喷雾）干燥获得河鮀 I 型胶原蛋白提取物；

(4) 可选择地，进行干燥粉碎：

将提取物或其浓缩液经干燥（可选择喷雾干燥、冷冻干燥，或者微波干燥、烘干、阴干，优选冷冻干燥或喷雾干燥）后粉碎至 80 目以上，得淡黄色或白色粉状产品——河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

其中，所用的酸液为有机酸或无机酸液，碱液为无机碱液，提取时的终浓度为 0.001 ~ 1.0 mol/L，脱毒时的终浓度为 0.01 ~ 0.5 mol/L。可以所采用的酸是例如：甲酸，乙酸，丙酸，丙二酸，丁酸，丁二酸，苹果酸，枸橼酸，酒石酸，乳酸，磷酸，盐酸，硫酸，硝酸；所采用的碱是例如：氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化钙（石灰水），碳酸钠；所采用的酶是例如：胰蛋白酶，胰酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶、中性蛋白酶，链霉蛋白酶，凝血酶，明胶酶，Ⅱ型胶原酶，Ⅲ型胶原酶，蛋白酶 K 及其它动植物和微生物来源的各种蛋白水解酶。

在优选的实施方案中，在过滤浓缩步骤后还可按下述两种方法之一进行控制性部分水解处理：

(1) 蛋白水解酶水解，条件：反应体系中的蛋白水解酶浓度为 1 ~ 100 mg/100g 湿重组织，优选 10 ~ 50 mg 酶/100 g 湿重组织，搅拌，温度为 20°C ~ 65 °C，优选温度为 30°C ~ 37°C，时间为 3 小时 ~ 100 小时，优选 3 小时至 48 小时，酶解结束后，100°C 加热 5 ~ 10 分钟终止酶活力；

(2) 有机酸和/或无机酸水解，条件：反应体系中的酸浓度为 0.001 mol/L ~ 1.0 mol/L，优选 0.05 ~ 0.50 mol/L，搅拌，温度为 0°C ~ 100 °C，优选 25°C ~ 75°C，时间为 60 分钟 ~ 72 小时后，优选 3 小时 ~ 24 小时，中和或减压脱酸；

其中，可以所采用的酸是例如：甲酸，乙酸，丙酸，丙二酸，

丁酸，丁二酸，苹果酸，枸橼酸，酒石酸，乳酸，磷酸，盐酸，硫酸，硝酸；所采用的碱是例如：氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化钙（石灰水），碳酸钠；所采用的酶是例如：胰蛋白酶，胰酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶、中性蛋白酶，链霉蛋白酶，凝血酶，明胶酶，Ⅱ型胶原酶，Ⅲ型胶原酶，蛋白酶K 及其它动植物和微生物来源的各种蛋白水解酶。优选的酶是Ⅲ型胶原酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶；优选的酸是乙酸和盐酸。

可选择的，再将水解液浓缩，可浓缩至原体积的 100%~10%，将水解浓缩液干燥即得，或进行沉淀处理，干燥即得河鲀 I 型胶原蛋白提取物。

在进一步优选的实施方案中，在浓缩步骤后还可按下述两种方法之一进行沉淀处理：

(1) 向提取浓缩液中加入其 8~15 倍体积量的冷丙酮，优选 10~12 倍体积量，在 10℃ 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，干燥得河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

(2) 向提取浓缩液中加入冷乙醇至终浓度为 55~90%，优选 75~90%，在 10℃ 以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，可选择的，干燥得到河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

优选的，将所得沉淀用含 1.0~2.2 mol/L 氯化钠的中性缓冲液 (pH7.5) 或直接用 1.0~2.2 mol/L 氯化钠溶液反复抽提，抽提液脱盐，可选择的进行干燥，得较高纯度河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

在更优选的实施方案中，其中将上述步骤中得到的提取液用 DEAE- 和 / 或 CM- 离子交换法纯化，除去杂蛋白，离子交换洗脱液脱盐后干燥，即得高纯度河鲀 I 型胶原蛋白提取物。

下面对本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物制备工艺进行更详细的说明：

(1) 原料预处理：

a. 天然河鲀鱼皮、鱼骨原料的脱毒预处理：在 0℃ ~ 50℃，用酸液或碱液处理 4 小时 ~ 48 小时，充分水洗，如此重复 4 至 6 次；

使用碱液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，碱液终浓度为 0.01 ~ 0.1 mol/L, 20℃ ~ 30℃，脱毒 8 小时 ~ 24 小时，重复 4 ~ 5 次；使用酸液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，酸液终浓度为 0.1 ~ 0.2 mol/L, 0℃ ~ 20℃，脱毒 6 小时 ~ 24 小时，重复 4 ~ 5 次；

b. 用水将人工繁育淡水饲养的河鲀鱼皮、鱼骨原料或脱毒后的天然河鲀鱼皮、鱼骨原料洗净，如暂时不用，可于 -20℃ 以下长期冷冻保存备用；

此步骤主要特征在于提取原料使用了河鲀鱼皮、鱼骨和鱼鳍以及（对有毒原料）进行脱毒处理。对于有毒原料使用酸碱液处理，目的是为了脱毒，酸碱用量少，处理时间短；对于无毒原料，则只需要充分洗净即可使用，耗时很短，无大量废酸废碱液产生。这一点是河鲀 I 型胶原蛋白提取物产品安全性、高效性之基础。而现有所有河鲀胶、河鲀鱼皮胶原制备工艺仅使用河鲀鱼皮作为提取原料，除杂蛋白使用的酸碱浓度较高、量较大且工艺时间很长，在此期间对河鲀 I 型胶原蛋白结构与活性有一定影响，从而不能保证其药理学活性。而且对脱毒是否完全没有进行控制与要求，河鲀鱼骨也未利用，同时产生大量废酸废碱液。

(2) 提取，按上述三种提取方法之一进行：

a. 向预处理后的河鲀鱼皮、鱼骨为任意比例的原料中加入水或酸液，在0℃～125℃，常压～3个大气压下，提取60分钟～100小时，滤取液态部分，如此重复0～6次，合并滤液，将残渣加水或与滤液合并粉碎匀浆得匀浆液，以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在20℃以下放置12～48小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压，0℃～10℃，酸液反应终浓度范围是0.1～0.5 mol/L，提取48～72小时，重复2～4次，匀浆；以及常压，40℃～80℃，酸液反应终浓度范围是0.01～0.2 mol/L，提取4小时～8小时，重复3～5次，匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压，90℃～100℃，提取3小时～8小时，重复1～3次，匀浆；

b. 向预处理后的河鲀鱼骨原料加入水或酸液，在0℃～125℃，常压～3个大气压下，提取60分钟～100小时，滤取液态部分，如此重复0～6次，合并滤液，弃去残渣，将滤液浓缩至原体积的100%～10%后，加入适量河鲀鱼皮原料，在0℃～125℃，常压至3个大气压下，提取60分钟～100小时，滤取液态部分，再加水或同样的酸液提取，如此重复0～6次，合并滤液，将残渣与滤液合并后粉碎匀浆得匀浆液。以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在20℃以下放置12～48小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压，0℃～10℃，酸液反应终浓度范围是0.1～0.5 mol/L，提取48～72小时，重复2～4次，匀浆；以及常压，40℃～80℃，酸液反应终浓度范围是0.01～0.2 mol/L，提取4小时～8小时，重复3～5次，

匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压，90℃～100℃，提取3小时～8小时，重复1～3次，匀浆。

该步骤从预处理后的河鲀鱼皮和鱼骨（鳍）以任意比例组成的混合物中直接提取获得河鲀I型胶原蛋白提取液，或先从鱼骨（鳍）中获得提取液，然后再以该提取液为提取溶剂从鱼皮中提取获得河鲀I型胶原蛋白提取液。此步骤主要特征在于，提取时可直接用水或稀酸溶液在较高温度提取原料中的I型胶原蛋白，并在匀浆后充分提取I型胶原蛋白12～48小时；或在低温时用弱酸稀溶液抽提原料并在匀浆后充分提取I型胶原蛋白12～48小时，从而保证了本发明生产工艺的短周期和高效率。这是本提取工艺的创造性发明之一。上述提取方法利用了I型胶原蛋白与其它蛋白质在溶解性质方面的两个重要差别：（1）I型胶原蛋白可溶于稀酸溶液，尤其是当稀酸溶液温度大于40℃时，I型胶原的溶解度极高，几乎全部溶入酸液。而其它绝大多数蛋白质此时则溶解度下降形成不溶性变性蛋白沉淀与I型胶原蛋白分相分离，易于离心或过滤除去；（2）I型胶原蛋白受热变性后可溶于热水中，而其它蛋白质受热变性则形成沉淀，与I型胶原蛋白完全分相分离。另一方面，本发明还发现河鲀I型胶原蛋白提取物的水溶液在100℃以下、稀酸溶液在80℃以下加热数小时，其药理学活性非常稳定。这是本发明提取工艺应用于提取河鲀I型胶原蛋白提取物的创新和独特之处，也是本发明高效提取高纯度河鲀I型胶原蛋白提取物的理论依据与保证。而现有工艺仅用稀酸在低温长时间提取，并使用大量胃蛋白酶水解提取（这样又带入了外源杂蛋白），或用碱液长时间处理去杂蛋白后再用沸水反复提取，因而时间长、耗能大、成本高、有三废，产物活性也受到一

定影响。

c. 显然，本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物也可按现有的明胶和 I 型胶原常规方法或修改方法提取纯化 [Nagai, T. et al: Collagen of the skin of ocellate pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Food chemistry*, 2002, 78: 173 – 177.]，如将预处理后的河鲀鱼皮、鱼骨为任意比例的原料用稀碱、稀酸或蛋白水解酶处理除去杂蛋白后，水洗，脱脂，在 10℃ 以下用稀酸如 0.1~0.5mol/L 醋酸或盐酸等反复抽提后，匀浆，离心，将离心上清液、稀酸抽提液中和或不中和，在终浓度为 0.7~4.4mol/L 的中性盐如氯化钠溶液中逐级、反复盐析得 I 型胶原沉淀物；或在 10℃ 以下用中性盐如氯化钠稀溶液反复抽提过滤得 I 型胶原提取液；或用沸水反复抽提，过滤得变性 I 型胶原蛋白提取液。提取后的残渣用蛋白酶如胃蛋白酶水解处理，再行上述盐析得河鲀 I 型胶原蛋白。提取的 I 型胶原蛋白溶液用 DEAE- 或 CM- 离子交换剂纯化除去杂蛋白即得河鲀 I 型胶原蛋白。但是，如上所述，应用现有方法提取本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物，生产周期长，能耗大、成本高、有三废、产物的药理学活性因方法不同而有波动。

(3) 过滤浓缩：

匀浆液经离心或过滤去渣，滤液浓缩至原体积的 100% 至 10% 后，得河鲀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液；

其中使用酸液低温提取时，较为优选的去渣方法是低温高速离心；使用水或酸液高温提取时，较为优选的去渣方法是过滤；使用酸液低温提取时，较为优选的浓缩方法是应用 100~200Kda 孔径超滤膜超滤浓缩；使用水或酸液高温提取时，较为优选的浓缩方法是减压真空浓缩。

(4) 可选择的，进行干燥粉碎：

提取物浓缩液经喷雾干燥、冷冻干燥，或者烘干、阴干后粉碎至 80 目以上，得淡黄色或白色粉状制取物——主要含河鲀 I 型胶原蛋白或河鲀变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物的河鲀 I 型胶原蛋白提取物；其中较为优选的干燥方法是冷冻干燥或喷雾干燥。

其中，所用的酸液为有机酸或无机酸液，碱液为无机碱液，提取时的终浓度为 0.001~1.0 mol/L，脱毒时的终浓度为 0.01~0.5 mol/L；可以所采用的酸是例如：甲酸，乙酸，丙酸，丙二酸，丁酸，丁二酸，苹果酸，枸橼酸，酒石酸，乳酸，磷酸，盐酸，硫酸，硝酸；所采用的碱是例如：氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化钙（石灰水），碳酸钠；所采用的酶是例如：胰蛋白酶，胰酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶、中性蛋白酶，链霉蛋白酶，凝血酶，明胶酶，II型胶原酶，III型胶原酶，蛋白酶 K 及其它动植物和微生物来源的各种蛋白水解酶。

由于提取步骤对河鲀 I 型胶原蛋白的选择性提取以及提取原料中主要是 I 型胶原蛋白，因此，在上述提取液离心或过滤去渣后可直接进行（超滤）浓缩、（冷冻、喷雾）干燥获得河鲀 I 型胶原蛋白提取物。从而建立了制备河鲀 I 型胶原蛋白提取物的简便工艺方法，这是本发明工艺的创造性之一，是所有现有河鲀胶工艺所没有。

在上述提取步骤的浓缩步骤后还可以按下述两种方法之一进行控制性部分水解处理：

(1) 蛋白水解酶水解，条件：反应体系中的蛋白水解酶浓度为 1~100 mg/100g 湿重组组织，优选 10~50 mg 酶/100 g 湿重组组织，搅拌，温度为 20℃~65℃，优选温度为 30℃~37℃，时间为 3 小时~100 小时，优选 3 小时至 48 小时，酶解结束后，100℃

加热 5 ~ 10 分钟终止酶活力；

(2) 有机酸和/或无机酸水解，条件：反应体系中的酸浓度为 0.001 mol/L ~ 1.0 mol/L，优选 0.05 ~ 0.50 mol/L，搅拌，温度为 0°C ~ 100 °C，优选 25°C ~ 75°C，时间为 60 分钟 ~ 72 小时后，优选 3 小时 ~ 24 小时，中和或减压脱酸。其中优选的酶是Ⅲ型胶原酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶；优选的酸是乙酸和盐酸。在所有现有河鲀胶生产工艺中没有此水解步骤，但是河鲀 I 型胶原蛋白提取液的控制性水解对产生药理学高活性产物非常重要。这是本发明工艺的进一步的特点。

将水解液浓缩至原体积的 100% 至 10% 后，将水解浓缩液（喷雾、冷冻）干燥即得，或按下述两种沉淀方法之一进行沉淀处理，沉淀干燥得主要含河鲀 I 型胶原蛋白或河鲀变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物的河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

在上述提取步骤的浓缩步骤后，也可以按下述两种沉淀方法之一进行沉淀处理：

(1) 向提取浓缩液中加入其 8 ~ 15 倍体积量的冷丙酮，优选 10 ~ 12 倍体积量，在 10°C 以下沉淀 24 ~ 48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，干燥得河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

(2) 向提取浓缩液中加入冷乙醇至终浓度为 55 ~ 90%，优选 75 ~ 90%，在 10°C 以下沉淀 24 ~ 48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，可选择的，干燥得到河鲀 I 型胶原蛋白提取物。在所有现有河鲀 I 型胶原蛋白提取工艺中均未使用冷丙酮或乙醇进行沉淀处理，而这样的沉淀工艺易于实现工业化，沉淀效率高，丙酮及乙醇可回收再利用，产物中的试剂残留易于去除。而使用 NaCl 盐析则沉淀效率较低，大量 NaCl 和部分杂蛋白也随产物共同沉淀，必须增加后续工艺步骤除去。这一步骤形成了本

发明另一个进一步的特点。

本发明亦可以将上述沉淀步骤所得沉淀用含 1.0~2.2mol/L 氯化钠的中性缓冲液 (pH7.5) 或直接用 1.0~2.2mol/L 氯化钠溶液反向反复抽提，抽提液脱盐，干燥，得高纯度河鮀 I 型胶原蛋白。这在所有现有河鮀胶、河鮀 I 型胶原蛋白的提取、生产工艺中是没有的。这一步骤是本发明又一个进一步的特点。

由于河鮀 I 型胶原蛋白提取物是蛋白质，因此，可以用专一性高灵敏度免疫学方法进行检测、定量，如免疫扩散法、对流免疫电泳法、免疫浊度法、固相酶联免疫斑点技术 (ELISPOT)、ELISA 和 RIA 等。本发明首次提出了河鮀 I 型胶原蛋白提取物的各种免疫学检测方法。

本发明的河鮀 I 型胶原蛋白提取物的特征如下：

(1) 河鮀 I 型胶原蛋白提取物是以河鮀鱼皮和/或河鮀鱼骨(鳍)为原料制备的，以河鮀 I 型胶原蛋白或其变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物为主要化学成分和药理学活性成分，具有如权利要求 1 所述的药理学与生物学活性，并具有典型的(鱼类) I 型胶原蛋白理化性质(图 1~4；表 1~3、表 5)；

(2) 河鮀 I 型胶原蛋白提取物的河鮀 I 型胶原蛋白或河鮀变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物的含量大于 50%，总蛋白含量大于 70%；

(3) 河鮀 I 型胶原蛋白三聚体 [ $\alpha_1(I)$ ]<sub>2</sub> $\alpha_2(I)$  分子量范围为 300~420 KDa，河鮀变性 I 型胶原蛋白 [包括  $\alpha_1(I)$  单体、 $\alpha_2(I)$  单体、 $\alpha_1(I)$  2 二聚体和  $\alpha_1(I)\alpha_2(I)$  二聚体] 及其部分水解物分子量范围为 60~300KDa；等电聚焦法测得河鮀 I 型胶原蛋白两个亚基的等电点分别为  $\alpha_1(I)$ : 4.85 ± 0.5 和  $\alpha$

2(I):  $6.71 \pm 0.5$  (图 1), 但是河鲀 I 型胶原蛋白两个亚基的等电点可随河鲀品种的不同而有差异;

(4) 经紫外吸收扫描显示, 以  $0.2\text{mol/L}$  醋酸为溶剂的  $0.3\text{mg/ml}$  河鲀 I 型胶原蛋白提取物溶液的紫外吸收最大波长为  $226 \pm 3\text{ nm}$ ; 以  $0.1\text{mol/L}$  盐酸为溶剂的  $0.1\text{mg/ml}$  河鲀 I 型胶原蛋白提取物溶液紫外吸收最大波长为  $203 \pm 3\text{ nm}$ 。而且在  $260 \sim 280\text{nm}$  波长处无吸收峰且吸收值较小 (图 3);

(5) 经 Kivirikko 法与氨基酸自动分析仪测定, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物羟脯氨酸重量百分比含量大于  $4.5\%$ , 类似其它鱼类胶原蛋白, 鱼类胶原蛋白羟脯氨酸重量百分比一般低于  $10\%$ , 显著低于陆地动物胶原蛋白的羟脯氨酸含量 ( $14\%$ ); 本发明所述的工艺方法所得到的河鲀 I 型胶原蛋白提取物的氨基酸组成如表 1 ~ 表 3 和表 5 所示; 河鲀 I 型胶原蛋白提取物是糖蛋白, 其蛋白结合糖含量为  $0.5\% \sim 1.9\%$ ; 可以理解, 数据之间的差异是由于提取原料的不同和提取工艺条件的差异造成, 但它们均是以河鲀 I 型胶原蛋白作为主要化学成分和药理学活性成分为基础而测得。

(6) 河鲀 I 型胶原蛋白提取物可溶于水和稀酸溶液。其水溶液对热稳定, 在  $95^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$  加热数小时, 仍可保持药理学活性不变; 河鲀 I 型胶原蛋白提取物的弱酸稀溶液 (小于  $0.5\text{mol/L}$ ) 于  $-20^\circ\text{C} \sim$  室温长期放置, 药理学活性可基本保持稳定不变; 但是, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对碱非常敏感, 在低浓度的弱碱溶液中, 即使室温放置数小时, 其药理学活性可完全丧失, 而存在于河鲀鱼皮和鱼骨组织中的河鲀 I 型胶原蛋白在低温对稀碱溶液则较为稳定; 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 III型胶原酶不敏感, 对 I 型胶原酶敏感。经 I 型胶原酶水解处理, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物的

药理学活性迅速下降。

本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物制备工艺所用的酸液为有机或无机酸液，碱液为无机碱液，酸、碱液及蛋白水解酶各有多 种。作为具体例子，所采用的酸是例如：甲酸，乙酸，丙酸，丙二酸，丁酸，丁二酸，苹果酸，枸橼酸，酒石酸，乳酸，磷酸，盐酸，硫酸，硝酸；所采用的碱是例如：氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化钙（石灰水），碳酸钠；所采用的酶是例如：胰蛋白酶，胰酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶、中性蛋白酶，链霉蛋白酶，凝血酶，明胶酶，Ⅱ型胶原酶，Ⅲ型胶原酶，蛋白酶 K 及其它动植物和微生物来源的各种蛋白水解酶。

本发明所述河鲀可以来源于：鱼类分类学中鲀亚目 (*Tetraodontoidei*) 鲀科 (*Tetraodontidae*) 东方鲀属 (*Fugu*) 中所有东方鲀鱼种，包括：暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus*)、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*)、假晴东方鲀 (*Fugu pseudommus*)、条纹（黄鳍）东方鲀 (*Fugu xanthopterus*)、菊黄东方鲀 (*Fugu flavidus*)、墨绿东方鲀 (*Fugu basilewskianus*)、网纹东方鲀 (*Fugu reticularis*)、紫色东方鲀 (*Fugu porphyreus*)、虫纹东方鲀 (*Fugu vermicularis*)、双斑东方鲀 (*Fugu bimaculatus*)、豹纹东方鲀 (*Fugu pardalis*)、星点东方鲀 (*Fugu niphobles*)、铅点东方鲀 (*Fugu albopumbeus*)、横纹东方鲀 (*Fugu oblongus*)、弓斑东方鲀 (*Fugu ocellatus*)、圆斑东方鲀 (*Fugu orbimaculatus*)、晕环东方鲀 (*Fugu coronoides*) 等东方鲀；叉鼻鲀属 (*Arothron*) 河鲀，如星斑叉鼻鲀 (*Arothron stellatus*)、纹腹叉鼻鲀 (*Arothron hispidus*)、黑斑叉鼻鲀 (*Arothron nigropunctatus*) 等；以及以下河鲀鱼种类，包括密沟鲀

(*Liosaccus cutaneus*)、粒突箱鲀 (*Ostracion tuberculatus*)、翻车鲀 (*Mola mola*)、矛尾翻车鲀 (*Masturus lanceolatus*)、短吻三刺鲀 (*Triacanthus brevirostris*)、尖吻三刺鲀 (*Triacanthus strigilfera*)、革鲀 (*Aluterus monoceros*)、九斑刺鲀 (*Diodon novemaculatus*)、六斑刺鲀 (*Diodon holacanthus*)、密斑刺鲀 (*Diodon hystrix*)、斑鳍短刺鲀 (*Chilomycterus affinis*)、暗鳍腹刺鲀 (*Gastrophysus gloveri*)、月腹刺鲀 (*Gastrophysus lunaris*)。上述河鲀可来自天然海洋，江河及湖泊，或经人工繁育淡水饲养的河鲀（包括巴鱼）。

可以用公知的方法将河鲀 I 型胶原蛋白提取物加工成各种形式的药物或保健食品口服制剂。作为具体的剂型，可以举出：片剂（包括包衣片、素片、胃悬浮片、含片、泡腾片和咀嚼片），胶囊剂（包括软胶囊、微囊），颗粒剂，冲剂，泡腾颗粒剂，散剂（包括冻干粉），丸剂（包括滴丸），控释片剂（包括肠溶片剂，缓释片剂），控释胶囊剂（包括肠溶胶囊剂，缓释胶囊剂），果味制剂，咀嚼块，口服液，糖浆剂，口腔崩解剂，混悬剂，喷雾剂，溶液（包括汤剂），凝胶剂，乳剂，膏剂，滴剂等。

利用本发明方法制备的河鲀 I 型胶原蛋白提取物具有以下 10 项有益效果与特征：

1. 本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物的主要化学成分和药理学活性物质是河鲀鱼皮、鱼骨（鳍）天然未变性 I 型胶原蛋白或河鲀变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物，具有多种预料不到的生物学活性，因此河鲀 I 型胶原蛋白提取物非常具有医药治疗和保健应用前景和价值；
2. 特别需要指出的是，本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物之

突出特点在于其对胃肠道溃疡与炎症等疾病，如酒精性胃溃疡、酒精性胃粘膜损伤、酒精性胃出血、酒精性中毒、药物性胃溃疡、药物性胃粘膜损伤、药物性胃出血、十二指肠溃疡、肠易激综合症、结肠炎、急、慢性胃炎、浅表性胃炎、糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛具有极显著的预防、治疗与保健作用。

河鲀 I 型胶原蛋白提取物可极显著抑制模型动物胃泌素、胃酸、胃蛋白酶分泌。表明河鲀 I 型胶原蛋白提取物对消化性胃溃疡和胃酸过多症具有预防与治疗作用，是高效抗胃酸分泌剂。

河鲀 I 型胶原蛋白提取物可极显著升高胃粘膜保护因子 PGE<sub>2</sub> 和前列环素 -6-K 水平，并可极显著抑制诱导型一氧化氮合酶 iNOS 活力及其基因表达，显著促进构型一氧化氮合酶 cNOS 活力及其基因表达，抑制胃粘膜组织中源于 iNOS 产生的 NO 含量的病理性升高，升高源于 cNOS 产生的有益性 NO 含量。表明河鲀 I 型胶原蛋白提取物可通过 PGs 和 NO/NOS 途径经保护胃粘膜，舒张血管，改善胃粘膜血流量，对抗缺血性胃粘膜损伤和坏死，抑制炎症和胃肠道肿瘤的发生。因此，河鲀 I 型胶原蛋白提取物是高效胃粘膜保护剂。

3. 同时需要特别指出的是，本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物之另一突出特点在于其可抑制胶原蛋白在肝、胃等组织中的病理性沉积，显著抗新生血管生成（CAM 试验），说明河鲀 I 型胶原蛋白提取物对机体组织胶原蛋白的非正常合成具有抑制作用，可应用于酒精性肝损伤，酒精性脂肪肝，酒精性肝硬化，酒精性肝纤维化、肺和肾组织纤维化、胶原增生性疾病、需新生血管生成疾病以及实体肿瘤发生、发展和转移的预防与治疗。

而且，河鲀 I 型胶原蛋白提取物可显著降低乙醇和药物诱发升高的血浆转氨酶水平，表明河鲀 I 型胶原蛋白提取物可抵御酒

精和药物对肝组织细胞的急性损伤作用。因此，河鮋 I 型胶原蛋白提取物具有高效肝保护作用。

4. 还要特别指出的是，本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物之另一突出特点在于其可极显著升高化疗药物引起降低的血液白细胞数，增加免疫器官胸腺的重量，增加体重，说明河鮋 I 型胶原蛋白提取物可增强和调节机体免疫功能，改善消化吸收，增强体质，减少化疗药物副作用。因此，河鮋 I 型胶原蛋白提取物具有高效免疫调节和保健作用。

5. 本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物具有多种极显著的药理活性和保健作用且药理作用起效快、药效作用维持时间长，即本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物具有高效性、速效性、长效性和多效性；

6. 本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物可显著改善胃肠道消化功能，调节胃动力，促进消化吸收，保持胃肠道的正常消化功能从而对生长期动物体重有显著的增加作用和促进生长作用；而且还具有显著的抑制胃排空作用，从而可抑制胃痉挛、腹痛和腹泻。本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物所具有的这些药理活性和保健作用是新发现的，从未有过的，也未在文献上发表过。

7. 本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物制备工艺除权利要求 4 步骤（2）的 c 方法是现有技术外，应用于提取河鮋 I 型胶原蛋白都是新的，也未在文献上发表过，不同于河鮋胶、河鮋胶原所有现有制造工艺；而且，权利要求 4 步骤（2）的 c 方法虽然是现有技术，但是大多未应用于提取河鮋 I 型胶原蛋白；

8. 本发明的河鮋 I 型胶原蛋白提取物制造工艺周期短(一般 2~4 天)、产率高、药理活性高、成本低、易于实施，因而是简便、高效、切实可行的，特别适合于大规模工业化生产，本发明

人也已按本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物制备工艺成功实施了 3 次工业化规模中试生产；

9. 本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物不含河鲀毒素，也未观察到其它毒性，高度安全可靠，可长期口服；

10. 本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物制造工艺基本无三废。

因此，本发明之河鲀 I 型胶原蛋白提取物（河鲀天然未变性 I 型胶原蛋白或其变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物）的优化制备工艺是新的、从未有过的和易于实现大规模工业化生产的，也未在文献上发表过。

本发明所述术语“显著”或“极显著”乃是指按统计学上所定义的经适当统计学检验方法如 *t* 检验的 *P* 值小于 0.01 或 0.001 而言。

#### 附图说明

图 1：图中所示为河鲀 I 型胶原蛋白提取物经 DEAE-Sepharose fastflow 纯化后的等电聚焦电泳凝胶，经考马斯亮蓝 R-250 染色后显示的河鲀 I 型胶原蛋白两个亚基  $\alpha 1(I)$  和  $\alpha 2(I)$  的蛋白条带（根据标示习惯，图中表示为  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ），由于河鲀 I 型胶原蛋白中  $\alpha 1(I)$  亚基比  $\alpha 2(I)$  亚基多一倍，故易于从电泳条带染色强度区别它们。根据同时电泳的平行凝胶中 pH 梯度测定值，计算出处于对应位置的河鲀 I 型胶原蛋白两个亚基  $\alpha 1(I)$  和  $\alpha 2(I)$  的等电点，分别为  $4.85 \pm 0.5$  和  $6.71 \pm 0.5$ ，具体见实施例 1。

图 2：根据 I 型胶原蛋白电泳条带国际标示习惯，一般文献将 I 型胶原蛋白的两个亚基  $\alpha 1(I)$  和  $\alpha 2(I)$  电泳条带表示为  $\alpha$

$\alpha_1$  和  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1(I)_2$  二聚体和  $\alpha_1(I)\alpha_2(I)$  二聚体的电泳条带表示为  $\beta$  ( $\beta_1$ 、 $\beta_2$ ),  $[\alpha_1(I)]_2\alpha_2(I)$  三聚体的电泳条带表示为  $\gamma$ 。I型胶原蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中的电泳顺序谱为:  $\alpha_2$ 、 $\alpha_1$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 。 $\gamma$  条带由于分子量巨大(一般>300kDa)处于凝胶原点附近,  $\beta$  条带通常仅显示一条电泳带,  $\alpha_1$  含量与条带强度是  $\alpha_2$  的两倍, 两者分子量接近, 故电泳位置也接近, 但是  $\alpha_2$  在  $\alpha_1$  条带前。图 2 所示为河鲀 I 型胶原蛋白提取物经 DEAE-Sepharose fastflow 纯化后的 3.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳谱, 该产物电泳谱显示为典型的 I 型胶原电泳谱, 具体见实施例 10。

图 3: 图中所示为, 以 0.1mol/L 盐酸为溶剂的 0.1mg/ml 河鲀 I 型胶原蛋白提取物溶液紫外吸收扫描图谱。可见其最大吸收波长为  $203 \pm 3$  nm。而且在  $260 \sim 280$  nm 波长处无吸收峰且吸收值较小, 具体见实施例 12。

图 4: 图中所示为河鲀 I 型胶原蛋白提取物经控制性部分水解后的 5% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 谱, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物电泳条带呈现典型的 I 型胶原蛋白电泳谱特征, 具体见实施例 18。

图 5: 按常规单向免疫扩散方法进行河鲀 I 型胶原蛋白提取物鉴别试验。河鲀 I 型胶原蛋白浓度与其沉淀环直径成正相关。结果见附图 5。图中的白色圆环为河鲀 I 型胶原蛋白与其兔抗血清扩散形成的专一免疫沉淀环。用对照品如各种非河鲀鱼皮, 鱼鳔, 鱼骨, 明胶, 阿胶, 猪皮等的胶原蛋白或变性胶原蛋白进行本试验, 则无免疫沉淀环形成, 表明本鉴别试验具有专属性。具体见实施例 31。

图 6: 按常规对流免疫电泳方法, 观察河鲀 I 型胶原蛋白出

现的免疫沉淀线。结果见附图 6。图中下半区的白色条带为河鲀 I 型胶原蛋白与其免抗血清电泳后形成的专一免疫沉淀线，上半区为对照品的胶原蛋白或变性胶原蛋白电泳区，可见无免疫沉淀线形成，对照品来自各种非河鲀鱼皮，鱼鳔，鱼骨，明胶，阿胶，猪皮等。表明本鉴别试验具有专属性。具体见实施例 31。

### 具体实施方式

由于河鲀毒素在碱性条件下被迅速破坏失去毒性，所以河鲀 I 型胶原蛋白提取物制备原料鱼皮、鱼骨、鱼鳍的最佳脱毒方法是用碱液处理。由于河鲀 I 型胶原蛋白提取物属于胶原蛋白和/或变性胶原多肽，所以其最佳提取溶剂是用水或稀酸液，最佳干燥方法是冷冻干燥，最佳水解方法是控制性酶水解或酸水解法，最佳沉淀方法是丙酮沉淀法。河鲀 I 型胶原蛋白提取物口服制剂的最佳用途是用于消化道疾病（各种胃溃疡、胃出血、酒精性与药物性肝损伤和肝纤维化、十二指肠溃疡、急/慢性胃炎、胃痉挛、胃痛、肠易激综合症、结肠炎、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良）、免疫功能失调和下降、白细胞减少症的治疗与预防。

具体实施例：下面是说明本发明专利的具体实施例，但是本发明专利不局限于下述这些实施例。如未作特别说明，下述实施例中所用河鲀鱼皮、鱼骨（鳍）均来自人工繁育淡水饲养的河鲀。

实施例 1：取河鲀鱼皮 100 克，加去离子水 500ml，于 100 °C 加热提取 8 小时后，匀浆，匀浆液经高速离心澄清后，上清液加 NaCl 至 0.2mol/L 终浓度，过 DEAE-Sephadex fastflow 柱，以 0.2mol/L NaCl 溶液洗脱，洗脱液经超滤脱盐浓缩，浓缩液喷雾

干燥即得淡黄色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。等电聚焦法测得该样品河鲀 I 型胶原蛋白两个亚基的等电点分别为  $\alpha_1(I): 4.85 \pm 0.5$  和  $\alpha_2(I): 6.71 \pm 0.5$  (见图 1)。经三氟醋酸水解后用邻甲苯胺法测定该河鲀 I 型胶原蛋白提取物蛋白结合糖含量为 1.16%。

**实施例 2:** 取河鲀鱼骨(鳍) 500 克, 加去离子水 1500ml, 于 100℃ 加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液真空浓缩至 200ml, 加 HCl 至终浓度为 0.2mol/L, 60℃ 水解 2 小时后, 水解液浓缩脱酸, 离心澄清, 离心上清液调 pH7.4 后, 加 NaCl 至 0.18mol/L, 过 DEAE-纤维素柱, 用 0.2mol/LNaCl 溶液洗脱, 洗脱液超滤脱盐浓缩, 喷雾干燥得 47.2 克淡黄色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

**实施例 3:** 取河鲀鱼皮 100 克, 加去离子水 1000ml, 于 110℃, 2 个大气压力下, 加热提取 60 分钟, 匀浆, 匀浆液真空浓缩至 150ml, 加冰醋酸至终浓度为 0.8mol/L, 45℃ 水解 4 小时。水解液离心澄清, 喷雾干燥得 23 克淡黄色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。经 Kivirikko 法测定, 其胶原含量为 75.92%。克氏定氮法测定, 其总蛋白含量为 86.22%。

**实施例 4:** 取河鲀鱼骨(鳍) 500 克, 河鲀鱼皮 100 克, 加去离子水 2000ml, 于 125℃, 3 个大气压力下, 加热提取 2 小时, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加水 1000ml 同样提取, 如此重复共提取 3 次, 合并所有滤液, 真空浓缩至 200ml, 浓缩液加 HCl 至终浓度为 0.01mol/L, 75℃ 水解 8 小时, 离心使澄清, 离心上清液喷雾干燥得 46 克淡黄色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

实施例 5：取河鲀鱼皮 100 克，加去离子水 500ml，于 100 ℃加热提取 5 小时，过滤，滤液备用，滤渣再加水 250ml 同样提取，如此重复共 2 次，合并滤液并用滤液将残渣匀浆，匀浆液经离心澄清后，在 0.2mol/LNaCl 存在下，过 DEAE-52 纤维素柱，洗脱液超滤脱盐并浓缩至 150ml 后，加入 10 倍体积冷丙酮，于 4℃沉淀过夜，过滤得灰白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物沉淀，干燥后得 21.5 克产物。分析测定该产物蛋白结合糖含量为 1.12%。

实施例 6：取天然河鲀鱼皮(有毒)500 克，加 0.01mol/L 氢氧化钠 5000ml，于 4℃浸泡 24 小时，倾去浸泡碱液，再加氢氧化钠同样浸泡处理，共 5 次，用蒸馏水充分洗去剩余碱液后，加 0.1mol/L 盐酸 3500ml 浸泡提取 48 小时，匀浆，匀浆液离心后，上清液冷冻干燥，得 106.6 克浅白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物冻干粉。

实施例 7：取河鲀鱼皮 120 克，加 0.05mol/L 盐酸 1000ml，于 50℃浸泡 12 小时，酸液倾入另一装有 370 克河鲀鱼骨(鳍)的容器中，于 50℃浸泡 48 小时后，粉碎匀浆，匀浆液离心，离心上清液加入上述盐酸浸泡过的河鲀鱼皮中，匀浆，匀浆液于 70 ℃减压浓缩除酸，浓缩液经离心后，离心上清液调 pH7.4，加 NaCl 至 0.18mol/L，过 DEAE-纤维素柱，以 0.2mol/LNaCl 溶液洗脱，洗脱液超滤浓缩脱盐，喷雾干燥得 53.5 克浅白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

实施例 8：取河鲀鱼皮 50 克，加 0.5mol/L 醋酸 600ml，于

10℃以下浸泡 72 小时，期间刮去表层色素，匀浆，匀浆液离心，离心上清冷冻干燥，得 11 克浅白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物冻干粉。其氨基酸组成见表 1。

**表 1、河鲀 I 型胶原蛋白提取物冻干粉氨基酸组成分析结果**

氨基酸	重量百分含量 (%)	氨基酸	重量百分含量 (%)
天冬氨酸	7.12	甲硫氨酸	1.34
苏氨酸	3.47	异亮氨酸	1.10
丝氨酸	3.83	亮氨酸	2.43
谷氨酸	8.70	酪氨酸	0.24
脯氨酸	15.89	苯丙氨酸	2.62
甘氨酸	15.40	赖氨酸	4.81
丙氨酸	11.08	组氨酸	0.97
胱氨酸	0.55	精氨酸	10.16
缬氨酸	2.98	羟脯氨酸	7.30

**实施例 9：**天然河鲀鱼皮(有毒)500 克，加 0.1mol/L 氢氧化钠 2000ml，于 4℃浸泡 12 小时，倾去浸泡碱液，再加氢氧化钠同样浸泡处理 4 次，用蒸馏水充分洗去剩余碱液后，加 0.5mol/L 醋酸 7500ml，浸泡 48 小时后，匀浆，离心，离心上清调 pH7.5 后，加氯化钠至终浓度为 2.5mol/L，于 10℃以下沉淀 36 小时，离心取沉淀，沉淀复溶于 0.1mol/L 醋酸，超滤脱盐，干燥，得 119.5 克白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物冻干粉。

经 3.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，该产物电泳谱显示为典型的 I 型胶原(见图 2)。经克氏定氮与 Lowry 法测得该河鲀 I 型胶原蛋白提取物总蛋白含量为 92%。Kivirikko 法测得其胶原蛋白含量为 83%。

**实施例 10：**取河鲀鱼皮 100 克，加 0.1mol/L 盐酸 800ml，

于 0℃浸泡 48 小时后，充分匀浆，匀浆液离心，向离心上清中加氯化钠达终浓度为 1.0mol/L，于 4℃放置 24 小时进行沉淀，11,000 × g 离心，沉淀复溶于 0.2mol/L 醋酸，对 pH7.5 的 0.2mol/L NaCl 溶液充分透析后，过 DEAE-Sepharose fast flow 柱，用 0.2mol/L NaCl 溶液作为洗脱液，收集 230nm 吸收组分，脱盐，冷冻干燥，得白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物冻干粉。经氨基酸自动分析仪分析测定，该河鲀 I 型胶原蛋白提取物氨基酸组成见表 2。按鱼类胶原蛋白羟脯氨酸重量百分比平均上限为 10% 计算，该产物胶原蛋白含量为 66.7%。

表 2、河鲀 I 型胶原蛋白提取物氨基酸组成分析结果

氨基酸	重量百分含量 (%)	氨基酸	重量百分含量 (%)
天冬氨酸	6.67	甲硫氨酸	1.33
苏氨酸	2.67	异亮氨酸	1.33
丝氨酸	4.00	亮氨酸	2.67
谷氨酸	8.00	酪氨酸	0.00
脯氨酸	10.67	苯丙氨酸	2.67
甘氨酸	24.00	赖氨酸	4.00
丙氨酸	10.67	组氨酸	1.33
胱氨酸	1.33	精氨酸	9.33
缬氨酸	2.67	羟脯氨酸	6.67

实施例 11：取河鲀鱼骨（鳍）500 克，河鲀鱼皮 200 克，加去离子水 2500ml，于 95℃，加热提取 2 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 2500ml 同样提取，如此重复共提取 4 次，合并滤液，真空浓缩至 350ml，向浓缩液中加盐酸至终浓度为 0.1mol/L，于 55℃水解 2 小时后，冷却，向水解液中缓慢加入 10 倍体积的丙酮，

边加边搅拌，于4℃放置48小时，过滤即得河鲀I型胶原蛋白提取物沉淀，沉淀干燥粉碎，得89.1克淡黄色河鲀I型胶原蛋白提取物干粉。其紫外吸收扫描图谱见图3。

**实施例12：**取河鲀鱼皮100克，加0.5mol/L醋酸1200ml，于10℃以下浸泡48小时，匀浆，匀浆液继续放置24小时后，离心，离心上清液调pH7.4后，加NaCl至0.2mol/L，过DEAE-纤维素柱，用0.2mol/LNaCl溶液洗脱，洗脱液补加NaCl至终浓度为2.4mol/L，4℃沉淀48小时，离心取沉淀，沉淀复溶于0.5mol/L醋酸，超滤脱盐，冷冻干燥得18.4克白色河鲀I型胶原蛋白提取物冻干粉。经氨基酸自动分析仪测定其氨基酸组成，结果见表3。

**表3、河鲀I型胶原蛋白提取物冻干粉氨基酸组成**

氨基酸	重量百分含量(%)	氨基酸	重量百分含量(%)
天冬氨酸	6.54	甲硫氨酸	1.25
苏氨酸	3.43	异亮氨酸	0.93
丝氨酸	3.43	亮氨酸	2.49
谷氨酸	9.66	酪氨酸	0.62
脯氨酸	14.33	苯丙氨酸	2.18
甘氨酸	20.25	赖氨酸	4.36
丙氨酸	10.90	组氨酸	1.25
胱氨酸	0.62	精氨酸	9.35
缬氨酸	2.49	羟脯氨酸	6.23

取上述河鲀I型胶原蛋白提取物冻干粉适量，复溶于0.01mol/L醋酸后，调pH7.4，分为三份。处理如下①一份用I型

胶原酶在 0.2mol/L NaCl、0.01mol/L CaCl<sub>2</sub> 存在下，于 37℃ 水解 3 小时后，100℃ 加热 3 分钟使酶失活，备用；②另一份同样平行处理，加 I 型胶原酶和终浓度为 0.01mol/L EDTA，但是不加 0.2mol/L NaCl、0.01mol/L CaCl<sub>2</sub> (EDTA 可抑制 I 型胶原酶的活力)；③第三份不加任何试剂，仅平行保温加热处理。取 SD 大鼠 40 个分为 4 组，按卫生部《新药（西药）临床前研究指导原则汇编》方法观察上述处理物对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用。结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤具有完全保护作用，但是其保护作用可被 I 型胶原酶迅速破坏，抑制 I 型胶原酶活力可消除其破坏作用。结果见表 4。

表 4. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用及 I 型胶原酶的破坏作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	途径	溃疡指数
病理模型组	NS	10	ig	123.3 ± 15.6
河鲀 I 型胶原蛋白提取物处理①	0.5g/kg	10	ig	67.7 ± 6.1
河鲀 I 型胶原蛋白提取物处理②	0.5g/kg	10	ig	0.5 ± 0.2
河鲀 I 型胶原蛋白提取物处理③	0.5g/kg	10	ig	0 ± 0

实施例 13：取河鲀鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 2500ml，于 100℃ 加热提取 10 小时后，过滤，滤渣弃去，向滤液中加入河鲀鱼皮 200 克，于 100℃ 加热提取 8 小时后，匀浆，匀浆液浓缩至 300ml 后，浓缩液调 pH 至 7.4 后加胶原酶Ⅲ至 10mg/100g 湿重

皮和 NaCl 至 0.2mol/L、CaCl<sub>2</sub> 至 0.01mol/L 终浓度，于 37℃ 水解 6 小时后，100℃ 加热使酶失活，水解液真空浓缩至 200ml，喷雾干燥得 87.5 克淡黄色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

实施例 14：取天然河鲀鱼皮（有毒）150 克，加 0.05mol/L 盐酸 1500ml，室温处理小 6 时，倾去浸泡酸液，水洗，再加同样盐酸浸泡处理 4 次，共 5 次，用水充分洗去剩余酸液后，加 0.5mol/L 醋酸 2000ml，匀浆，离心，离心上清液喷雾干燥，得 33.2 克白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

实施例 15：取河鲀鱼皮 100 克，加 0.5mol/L 醋酸 1200ml，于 10℃ 以下浸泡 48 小时，匀浆，匀浆液于 10℃ 以下继续放置 24 小时，离心，离心上清液过 CM-纤维素柱，以 0~0.2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱，收集 230nm 有吸收的洗脱液，洗脱液超滤脱盐浓缩后，加 10 倍体积冷丙酮于 10℃ 以下沉淀 24 小时，滤取沉淀，干燥得 24 克浅白色河鲀 I 型胶原蛋白提取物。

实施例 16：取河鲀鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 2000ml，于 100℃ 加热提取 10 小时后，过滤，滤液真空浓缩至 600ml。向浓缩液中加入河鲀鱼皮 120 克，于 100℃ 加热提取 8 小时后，匀浆，向匀浆液中加醋酸至终浓度为 0.5mol/L，于 60℃ 保温水解 6 小时，水解液离心，离心上清真空浓缩至 200ml，喷雾干燥即得河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉。经 5%SDS-PAGE 电泳检测，河鲀 I 型胶原蛋白提取物电泳条带呈典型的 I 型胶原特征（见图 4）。该河鲀 I 型胶原蛋白提取物氨基酸组成分析结果见表 5。经三氟醋酸水解后用邻甲苯胺法测定该河鲀 I 型胶原蛋白提取物蛋白结

合糖含量为 1.8%；用克氏定氮法测得该河鮀 I 型胶原蛋白提取物总蛋白含量为 80.5%；胶原蛋白含量为 55.9%。

表 5、河鮀 I 型胶原蛋白提取物氨基酸组成分析结果

氨基酸	重量百分含量(%)	氨基酸	重量百分含量 (%)
天冬氨酸	4.99	甲硫氨酸	1.74
苏氨酸	1.75	异亮氨酸	1.06
丝氨酸	2.07	亮氨酸	2.21
谷氨酸	9.44	酪氨酸	0.60
脯氨酸	9.21	苯丙氨酸	1.70
甘氨酸	19.41	赖氨酸	3.01
丙氨酸	7.85	组氨酸	0.83
胱氨酸	0.20	精氨酸	6.15
缬氨酸	2.32	羟脯氨酸	5.59

实施例 17：取河鮀鱼骨（鳍）500 克，加去离子水 2500ml，于 100℃加热提取 5 小时后，过滤，滤液备用，滤渣再加水 2500ml 同样提取，如此共提取 3 次，合并所有滤液，真空浓缩至 1500ml，向滤液中加入河鮀鱼皮 200 克，于 95℃加热提取 5 小时后，匀浆，向匀浆液中加浓盐酸至终浓度为 0.05mol/L 后，于 50℃密封水解 24 小时，过滤，滤液真空浓缩至 200ml 后，离心，离心上清液调 pH7.4 后，加 NaCl 至 0.2mol/L，过 DEAE- 纤维素柱，用 0.2mol/LNaCl 溶液洗脱，收集 230nm 有吸收的洗脱液，洗脱液超滤脱盐浓缩，喷雾干燥得 82.3 克淡黄色河鮀 I 型胶原蛋白提取物干粉。

实施例 18：取河鮀鱼皮 250 克，加去离子水 3000ml，于 95

℃加热提取 10 小时后, 过滤, 滤液备用, 滤渣再加去离子水 2000ml 同样提取 10 小时后, 将提取液连同提取残渣匀浆, 匀浆液经离心过滤后, 所有滤液合并, 80℃真空浓缩至 450ml。向浓缩液中加盐酸调 pH3 和胃蛋白酶至 50mg/100g 湿重皮, 于 35℃密闭水解 48 小时后, 100℃加热 5 分钟失活酶, 离心, 离心上清液调 pH7.4 后, 加 NaCl 至 0.2mol/L, 过 DEAE-纤维素柱, 用 0.2mol/LNaCl 溶液洗脱, 洗脱液超滤脱盐, 喷雾干燥得 53.3 克淡黄色产物。

#### 实施例 19: 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对无水乙醇胃粘膜损伤的保护作用

SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》方法进行。见表 6。

表 6. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对无水乙醇致大鼠胃粘膜损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	途径	溃疡指数	<i>p vs</i> 病理组
正常对照组	NS	10	ig	7.0 ± 5.2	<0.001
病理模型组	NS	10	ig	120.9 ± 22.6	
枸橼酸铋钾	100mg/kg	10	ig	15.0 ± 6.0	<0.001
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	ig	0 ± 0	<0.001
	中剂量	10	ig	4.6 ± 4.5	<0.001
	低剂量	10	ig	15.0 ± 4.2	<0.001

结果表明, 按照实施例 8 制备的河鲀 I 型胶原蛋白提取物对无水乙醇诱发的大鼠胃粘膜损伤有极显著保护作用。

#### 实施例 20: 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 Shay 大鼠胃溃疡的作

## 用

SD 大鼠 50 只，体重 180 - 200g，雌雄各半，南京医科大学实验动物中心提供。试验按卫生部《新药（西药）临床前研究指导原则汇编》方法进行。

表 7. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对幽门结扎  
Shay 大鼠胃溃疡的预防作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	途径	溃疡指数	<i>p vs</i> 病理组
病理模型组	NS	10	ig	$20.3 \pm 1.1$	
西米替丁	80mg/kg	10	ip	$15.8 \pm 1.5$	$<0.05$
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	ig	$1.7 \pm 1.1$	$<0.001$
	中剂量	10	ig	$2.7 \pm 2.5$	$<0.001$
	低剂量	10	ig	$3.6 \pm 2.7$	$<0.001$

结果表明，按照实施例 11 制备的河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对 Shay 大鼠胃溃疡有极显著预防作用。说明其对消化性胃溃疡有显著性预防治疗作用。

### 实施例 21: 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠酒精性脂肪肝的影响

SD 大鼠 40 只，体重 150g ~ 200g，雄性，购于南京医科大学实验动物中心。试验按《药理学实验指南 - 新药发现和药理学评价》（杜冠华译，科学出版社）及相关文献进行。见表 8

表 8. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠酒精性脂肪肝的影响

$(\bar{x} \pm SD)$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs 正常组

组别	剂量	动物数	肝胶原蛋白含量(%)	胃胶原蛋白含量(%)
正常组	NS	10	0.14 ± 0.04%	1.29 ± 0.4%
病理组	NS	10	0.25 ± 0.09%**	2.00 ± 0.63%*
河鮀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	0.20 ± 0.06%*	1.40 ± 0.48%*
	低剂量	10	0.19 ± 0.08%	1.68 ± 0.38%

结果表明,按照实施例 11 制备的河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性抑制酒精性脂肪肝大鼠肝脏和胃壁层胶原蛋白含量的病理性升高。表明河鮀 I 型胶原蛋白提取物可抑制胶原蛋白在肝脏和胃组织中的病理性合成。

实施例 22: 河鮀 I 型胶原蛋白提取物对醋酸灼烧型大鼠胃溃疡的作用: SD 大鼠 50 只, 体重 180 - 200g, 雌雄各半, 南京医科大学实验动物中心提供。试验按卫生部《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》方法进行。

表 9. 河鮀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠  
乙酸灼烧型胃溃疡的治疗作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	途径	溃疡面积 ( $mm^2$ )	$p$ vs 病理组
病理组	NS	10	ig	70.1 ± 34.4	
西米替丁	80mg/kg	10	ip	44.7 ± 38.4	<0.001
河鮀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	ig	12.6 ± 10.6	<0.001
	中剂量	10	ig	17.9 ± 12.2	<0.001
	低剂量	10	ig	15.0 ± 10.1	<0.001

结果表明, 河鮀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对醋酸灼

伤型胃溃疡有极显著治疗作用，对慢性胃溃疡有治疗作用，可显著促进溃疡部位的愈合。

**实施例 23：**河鲀 I 型胶原蛋白提取物对环磷酰胺诱发的小鼠白细胞数下降的影响：昆明小鼠 75 只，雌雄各半，体重 18-22g。试验按《新药（西药）临床前研究指导原则汇编》方法进行。

**表 10. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对环磷酰胺诱发降低的小鼠血液白细胞数(WBC) 的影响 ( $\bar{x} \pm SD$ )**

组别	剂量	动物数	途径	WBC ( $\times 10^9/L$ )
正常对照组	NS	15	i.g	$5.3 \pm 1.1$ **
病理模型组	100mg 环磷酰胺/kg	15	i.g	$3.3 \pm 1.7$
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	15	i.g	$6.3 \pm 2.0$ **
	中剂量	15	i.g	$4.2 \pm 1.9$
	低剂量	15	i.g	$3.6 \pm 1.4$ **

\*\* $P<0.01$ , vs 病理组 ## $P<0.01$ , vs 对照组

结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性升高环磷酰胺诱发的小鼠血液白细胞数下降。说明其可增强机体免疫能力，降低化疗药物副作用。

**实施例 24：**河鲀 I 型胶原蛋白提取物对吲哚美辛胃溃疡大鼠胃粘膜中 PGE<sub>2</sub> 含量的影响：

SD 大鼠 60 只，体重 180-200g，雌雄各半。吲哚美辛购自 sigma 公司。PGE<sub>2</sub> 含量用放射免疫法测定。试验按《药理学实验指南 - 新药发现和药理学评价》(杜冠华译，科学出版社) 等方法进行。结果见表 11。

表 11. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对吲哚美辛胃溃疡大鼠胃粘膜中 PGE<sub>2</sub>含量的影响 ( $\bar{x} \pm SD$ )， vs 病理组

组别	剂量	动物数	PGE <sub>2</sub> (pg/mg 蛋白)
正常对照组	NS	10	176 ± 79 <sup>**</sup>
病理模型组	NS	10	79 ± 16
枸橼酸铋钾组	100mg/kg	10	170 ± 104 <sup>*</sup>
河鲀 I 型胶原蛋白 提取物	高剂量	10	198 ± 141 <sup>*</sup>
	中剂量	10	140 ± 63 <sup>*</sup>
	低剂量	10	138 ± 91

结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对 PGE<sub>2</sub> 含量有显著升高作用。揭示河鲀 I 型胶原蛋白提取物保护、维持胃粘膜 PGE<sub>2</sub> 水平和胃粘膜血流量，是其抗溃疡作用和粘膜细胞保护机制之一。

#### 实施例 25：河鲀 I 型胶原蛋白提取物在大鼠体内的时间药效学试验

SD 大鼠 50 只，雌雄各半。观察药物在体内对乙醇性溃疡大鼠的时间药效学。结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物在给药后 30 分钟即达最大药效的 96.81%，说明河鲀 I 型胶原蛋白提取物起效迅速，而且其在给药后 18 小时仍保持最大药效的 77.78%，说明河鲀 I 型胶原蛋白提取物具有长效性。

#### 实施例 26：河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠十二指肠溃疡的影响

雄性 SD 大鼠 50 只，体重 250 - 300g。巯基乙胺购自 sigma

公司。试验按《药理学实验指南 - 新药发现和药理学评价》(杜冠华译, 科学出版社) 进行。

结果表明, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对巯基乙胺诱发的大鼠十二指肠溃疡有极显著预防作用。结果见表 12。

表 12: 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对巯基乙胺诱发的大鼠十二指肠溃疡的治疗作用

组别	剂量	动物数	溃疡指数	抑制率 (%)
病理组		8	2.8 ± 0.5	
法莫替丁	20mg/kg	7	2.0 ± 1.3	27.27
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	8	1.4 ± 0.9 <sup>**</sup>	50.00
	中剂量	8	1.8 ± 1.0 <sup>*</sup>	36.36
	低剂量	7	1.7 ± 1.4	37.66

实施例 27: 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对乙醇性胃溃疡大鼠胃粘膜一氧化氮含量、iNOS 活力以及 iNOS 和 cNOS 基因表达水平的影响

试验按卫生部《新药(西药)临床前研究指导原则汇编》方法进行大鼠乙醇性胃溃疡试验, 观察河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠胃粘膜一氧化氮含量、iNOS 活力以及 iNOS 和 cNOS 基因表达水平的影响。NOSs mRNA 用 Trizol 试剂盒提取后采用 RT-PCR 进行扩增。结果表明, 一方面, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性极显著降低乙醇损伤大鼠胃粘膜中一氧化氮水平、iNOS 活力以及 iNOS 基因表达水平, 并使一氧化氮含量和 iNOS 活力极显著降低至正常水平以下。同时另一方面, 河鲀 I 型胶原蛋白提取物极显著升高乙醇诱发的 cNOS 基因表达水平下降, 并恢复至正常水

平。表明河鮀 I 型胶原蛋白提取物对胃粘膜一氧化氮水平、 iNOS 活力、 iNOS 和 cNOS 基因表达的差别调节，是其胃粘膜保护、抗胃粘膜缺血损伤与坏死、预防与治疗胃肠道肿瘤、预防和治疗胃溃疡的重要机制之一。

### 实施例 28：河鮀 I 型胶原蛋白提取物长期毒性试验

试验按国家食品药品监督管理局《新药药理学与毒理学研究技术要求》和 ICH 有关方法，进行河鮀 I 型胶原蛋白提取物 Beagle 犬长期毒性试验。结果显示河鮀 I 型胶原蛋白提取物高、中剂量对三个月长期毒性试验犬体重有显著增加作用。河鮀 I 型胶原蛋白提取物高、中、低剂量对试验犬生化、血常规指标无显著影响。河鮀 I 型胶原蛋白提取物可升高实验动物胸腺指数，试验犬其余脏器系数均显示正常。结果表明，河鮀 I 型胶原蛋白提取物可长期服用，安全有效。大剂量服用可增加试验动物体重，提高机体免疫力。

### 实施例 29：河鮀 I 型胶原蛋白抗鸡胚血管生成（CAM）试验

鸡胚胎的正常发育包括位于卵黄膜内外部血管系统形成，卵黄膜由卵黄（蛋黄）运送营养物以发育胚胎。当河鮀 I 型胶原蛋白施于卵黄膜上时，其抗血管生成活性物质可以抑制在卵黄膜内发生的血管形成。

将含有不同量的河鮀 I 型胶原蛋白提取物及对照药物的甲基纤维素圆盘（惰性固体和透明基质）置于卵黄膜血管周边的外缘上，在此发生血管生成过程。阳性对照是含有 1.5mg/ml 2 - 甲氧基雌二醇的甲基纤维素圆盘。将对照和河鮀 I 型胶原蛋白提取物圆盘置于 3 天龄胚胎的卵黄膜上。在此点，只有主血管开始生长

至卵黄。同时将含有阴性对照或一定量河鲀 I 型胶原蛋白的甲基纤维素圆盘始终置于同一胚胎的卵黄膜上。两个圆盘以相对于胚胎头尾轴对称的方式放置，以便在对比评价河鲀 I 型胶原蛋白和阴性对照的功效时减少个体之间的差异。在圆盘放置后 24 小时评估血管形成，结果表示为其中血管形成受到影响的胚胎的百分比。当河鲀 I 型胶原蛋白圆盘与阴性对照（此时已有较多细小血管生成）对比，其血管生长途径出现偏离或减弱或当在圆盘下观察不到血管生长时可以认为血管形成受到抑制。结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物可显著抑制鸡胚新生血管的发生。

#### 实施例 30：人工繁育淡水饲养河鲀的河鲀毒素毒性的测定

在淡水人工繁育的暗纹东方鲀、红鳍东方鲀和菊黄东方鲀不同生长阶段取 50g ~ 1250g 体重河鲀（相当于 6 月至两岁年龄的鱼），解剖分取卵巢、精囊、肝脏、皮肤、血液、骨、肉、心脏、眼球和其余内脏，分别剪碎，按 1: 3 (w/v) 加 0.2mol/L 醋酸匀浆，匀浆液于室温放置 6 小时并不时搅动，用 1 mol/L 碳酸钠调 pH 6 ~ 7 后，给小鼠分别灌胃各种组织匀浆液 0.8ml/20g/ 次，每 8 小时一次，共 3 次（相当于 60kg 体重的人 24 小时内摄入 2.4kg 量），每种组织匀浆液各灌胃 5 只小鼠。结果：所有小鼠均存活，无一例死亡。证实淡水人工繁育河鲀在各个生长阶段无毒。

#### 实施例 31：河鲀 I 型胶原蛋白提取物的对流免疫电泳与免疫扩散法鉴别试验：将按照实施例 2 制备的河鲀 I 型胶原蛋白提取物经 DEAE-Sephadex fastflow 纯化后，免疫兔，获得河鲀 I 型胶原蛋白兔抗血清。按常规对流免疫电泳与免疫扩散方法进行试验。观察河鲀 I 型胶原蛋白提取物出现的免疫沉淀线。结果见

附图 5 和 6。图 5 中各个扩散环的大小与样品中河鲀 I 型胶原蛋白浓度成正相关。本试验也可作为定量方法测定河鲀 I 型胶原蛋白提取物有效成分含量。图 6 中下半区的白色条带为河鲀 I 型胶原蛋白提取物与其兔抗血清电泳后形成的专一免疫沉淀线，上半区为对照品的胶原蛋白或变性胶原蛋白电泳区，可见无免疫沉淀线形成，对照品来自各种非河鲀鱼皮，鱼鳔，鱼骨，sigma 商品明胶，阿胶，猪皮等。表明本鉴别试验具有专属性。

#### 实施例 32：河鲀 I 型胶原蛋白提取物片剂的制备工艺

将河鲀 I 型胶原蛋白提取物原料药与微晶纤维素和淀粉以一定比例混合均匀，一步制粒，干燥，加入适量干淀粉和滑石粉，混合均匀，压片，即得。

#### 实施例 33：河鲀 I 型胶原蛋白提取物胶囊和肠溶胶囊的制备工艺

将河鲀 I 型胶原蛋白提取物原料药与淀粉和羟丙纤维素以一定比例混合均匀，制粒，干燥，加入硬脂酸镁，混匀，装入 3 号胶囊或肠溶胶囊即得。

#### 实施例 34：河鲀 I 型胶原蛋白提取物咀嚼片制备工艺

将河鲀 I 型胶原蛋白提取物原料药与甘露醇以一定比例混合均匀，一步制粒，用 0.01 - 0.02 倍河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉重量的硬脂酸镁与香料混合，然后加到颗粒中，混合均匀，压片，即得。

#### 实施例 35：河鲀 I 型胶原蛋白提取物冲剂的制备工艺：取河

鮀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液，加入糖粉、糊精，制成软材，制颗粒，干燥，分装，即得。

#### 实施例 36：河鮀 I 型胶原蛋白提取物滴丸的制备工艺

取河鮀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液，加入适量的聚乙二醇 - 6000 和尼泊金乙酯，加热至 90 ~ 100℃，密闭并使保温在 80 ~ 90℃，调节液滴定量阀门，滴入 10 ~ 15℃ 的液状石蜡中，将滴丸沥尽并擦除液体石蜡，干燥，即得。

#### 实施例 37：河鮀 I 型胶原蛋白提取物胶剂的制备工艺

取按照实施例 8 制备的河鮀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液，加适量黄酒、冰糖，尼泊金乙酯，继续浓缩至稠膏状，冷凝，切片，真空包装即得。

#### 实施例 38：河鮀 I 型胶原蛋白提取物急性毒性试验

试验按国家食品药品监督管理局《新药药理学与毒理学研究技术要求》和 ICH 有关方法进行。预试验结果表明，按照实施例，8、9、11、12 和 16 制备的河鮀 I 型胶原蛋白提取物在最大浓度时，最大灌胃容量，分别灌胃小鼠，测不出急性毒性参数 LD<sub>50</sub>。

实验结果：给药后连续观察 7 天，未见动物死亡。结果表明，河鮀 I 型胶原蛋白提取物高度安全。

#### 实施例 39：河鮀 I 型胶原蛋白提取物对胃排空的影响

昆明种小鼠 105 只，体重 20—25g，雌雄各半。试验按卫生部《新药（西药）临床前研究指导原则汇编》方法和 Shi G., et. al. *Gut*, 41: 612-618, 1997. 酚红法进行。结果见表 13。

结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对小鼠胃排空和溴吡斯地明促进胃排空作用有极显著抑制作用。说明河鲀 I 型胶原蛋白提取物可阻断乙酰胆碱的作用，抑制乙酰胆碱对胃平滑肌的收缩刺激。延长食物在胃肠道中的滞留时间，促进食物的消化吸收。

表 13. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对  
小鼠胃排空的抑制作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	胃中酚红残留量 (mg)	胃排空率 (%)
标准组		15	7.61 ± 2.78	
正常对照组	NS	15	1.28 ± 0.75	86.0 ± 7.9 <sup>#</sup>
溴吡斯地明组	0.1mg/kg	15	0.47 ± 0.36	93.8 ± 4.8 <sup>*</sup>
河鲀 I 型胶原蛋白提取物+溴吡斯地明	高剂量 +0.1mg/kg	15	1.66 ± 0.17	84.0 ± 11.7 <sup>***</sup>
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	15	1.86 ± 0.1	75.0 ± 13.3 <sup>***</sup>
	中剂量	15	1.70 ± 0.16	77.2 ± 10.1 <sup>***</sup>
	低剂量	15	1.24 ± 0.58	83.2 ± 23.2 <sup>*</sup>

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.01$  vs 溴吡斯地明组 #  $P < 0.05$  vs 正常对照组

#### 实施例 40：河鲀 I 型胶原蛋白提取物泡腾片的制备工艺

本工艺采用微型胶囊制备方法的喷雾吸收干燥法，碳酸氢钠的聚乙二醇 - 6000 溶液经喷雾器喷雾于盛装河鲀 I 型胶原蛋白提取物干粉的包衣锅内，最后过筛，制成颗粒。将枸橼酸、阿斯

巴甜过筛，与河鲀 I 型胶原蛋白提取物颗粒及富马酸细粉一起混匀，压片，压片时填料处用红外灯照射。其工艺特点在于：聚乙二醇 - 6000 通过微囊包裹的方法将碳酸氢钠包裹起来；富马酸既起发泡剂又起水溶性润滑剂作用；压片时填料口用红外灯照射，控制颗粒的适宜温度，增加颗粒的软润性，进一步保证压片不粘冲。

#### 实施例 41：河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠乙醇性急性肝损伤的保护作用

SD 大鼠 50 只，体重 180-200g，雌雄各半。试验按卫生部《新药临床前研究指导原则汇编》方法进行。用自动生化分析仪测定血清谷丙转氨酶与谷草转氨酶活力。结果见表 5。

表 5. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠乙醇急性肝损伤的保护作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	途径	谷丙转氨酶 (U)	谷草转氨酶 (U)
正常组	NS	10	ig	41. 0 ± 3. 1 <sup>***</sup>	156. 7 ± 8. 1 <sup>***</sup>
病理组	NS	10	ig	59. 5 ± 5. 2	221. 3 ± 15. 6
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	ig	39. 0 ± 1. 4 <sup>***</sup>	162. 0 ± 4. 2 <sup>***</sup>
	中剂量	10	ig	38. 7 ± 6. 3 <sup>***</sup>	156. 3 ± 5. 7 <sup>***</sup>
	低剂量	10	ig	49. 7 ± 15. 0 <sup>**</sup>	186. 0 ± 20. 9 <sup>**</sup>

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  vs 病理组

结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物呈剂量依赖性对大鼠无水乙醇急性肝损伤有极显著保护作用。

#### 实施例 42：河鲀 I 型胶原蛋白提取物对大鼠醋酸性结肠炎

## 的治疗作用

试验按 Ritzpatrick, R. et al: *Agents Actions.* 1990, 30: 393-402 文献方法进行。用 10% 醋酸经 SD 大鼠直肠灌注造结肠炎模型，于造模型后第 4 天灌胃治疗给药 4 天。结果见表 14、表 15。

表 14、河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 10% 醋酸诱发的大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	溃疡指数评分
病理组	NS	10	$9.16 \pm 1.32^{**}$
空白组	NS	10	$0.33 \pm 0.51^{***}$
法莫替丁	10mg/kg	10	$4.14 \pm 3.76^*$
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	$3.33 \pm 3.66^{**}$
	中剂量	10	$5.14 \pm 3.93^*$
	低剂量	10	$7.33 \pm 3.54$

\*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05 vs 病理组; \*\*P<0.01, \*P<0.05 vs 法莫替丁

表 15、河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 10% 醋酸诱发的大鼠结肠炎肠体比的影响, ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量	动物数	肠重体重比 ( $\times 10^2$ )
病理组	NS	10	$2.32 \pm 1.06$
空白组	NS	10	$0.51 \pm 0.10^{**}$
法莫替丁	10mg/kg	10	$0.92 \pm 0.45^{**}$
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	10	$0.69 \pm 0.38^{**}$
	中剂量	10	$1.42 \pm 0.99$
	低剂量	10	$1.69 \pm 0.73$

\*\*\*P<0.001、 \*\*P<0.01、 \*P<0.05 vs 病理组

结果表明河鲀 I 型胶原蛋白提取物高、中剂量对 10% 醋酸诱发的溃疡性结肠炎有显著的治疗作用，但未恢复至正常水平。河鲀 I 型胶原蛋白提取物高剂量对醋酸性大鼠结肠炎肠重体重比有

显著保护作用。

**实施例 43：河鲀 I 型胶原蛋白提取物对三硝基苯磺酸 (TNBS) 诱发的大鼠结肠炎的治疗作用**

试验按 Morris, C. P. et al: *Gastroenterology*. 1989, 96: 795-803 文献方法进行。TNBS 购自 Sigma 公司。用 TNBS 100mg/kg 经 SD 大鼠直肠灌注造结肠炎模型，每组 10 个动物。于造模型后第 14 天灌胃治疗给药，共给药 7 天，第 21 天脱颈处死、解剖动物，结肠切片进行组织病理学观察。其中部分结果见表 16。

**表 16、河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 TNBS 诱发的大鼠结肠炎动物体重的影响. ( $\bar{x} \pm SD$ )**

组别	剂量	体重增加值	p vs 病理组
正常组	NS	75.45 ± 15.16	<0.01
病理模型组	NS	48.27 ± 24.48	
柳氮磺吡啶	0.3g/kg	68.89 ± 21.64	<0.05
河鲀 I 型胶原蛋白提取物	高剂量	77.22 ± 22.05	<0.01
	中剂量	70.25 ± 11.05	<0.05
	低剂量	66.22 ± 27.52	>0.05

结果表明，河鲀 I 型胶原蛋白提取物可显著升高 TNBS 诱发下降的大鼠结肠炎动物体重，使恢复至正常水平。结肠切片结果显示，河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 TNBS 诱发的大鼠结肠炎有显著治疗作用。

以上是对本发明的描述，应当理解，在不偏离本发明指导的前提下，本领域专业人员有足够的能力和知识通过用等同物或类似法代替本发明的某些内容来进行修改并达到同样的目的。因此这些显而易见的改变也被本申请所覆盖。

## 权利要求

1. 河鲀 I 型胶原蛋白提取物作为有效成分在制备治疗和预防如下疾病的药物和保健食品中的应用：胃肠道疾病，如胃溃疡、酒精性与药物性胃溃疡和胃出血、酒精性与药物性胃粘膜损伤、应激性胃溃疡、急慢性胃炎、浅表性与糜烂性胃炎、胃痉挛、胃痛、胆汁返流性胃溃疡、十二指肠溃疡、肠易激综合症、结肠炎、胃肠功能紊乱、胃动力失调、消化吸收不良及其引起的体重下降、腹胀、腹泻；肝细胞损伤与胶原增生性疾病，如酒精性肝损伤及其引起的肝纤维化和肝硬化、肝纤维化、肝硬化、药物性肝损伤及其引起的肝纤维化和肝硬化、肾纤维化、心肌纤维化；免疫性疾病，如免疫功能失调和下降、白细胞减少症、类风湿性关节炎、风湿性关节炎、红斑狼疮；肿瘤，如消化道恶性肿瘤发生、发展和转移、胃癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、其它实体恶性肿瘤发生、发展和转移、新生血管生成性疾病。
2. 权利要求 1 所述的河鲀 I 型胶原蛋白提取物作为有效成分在制备药物和保健食品中的应用，其特征在于该药物和保健食品是口服制剂。
3. 权利要求 1 所述的河鲀 I 型胶原蛋白提取物作为有效成分在制备药物和保健食品中的应用，其特征在于所述河鲀 I 型胶原蛋白提取物是用河鲀鱼皮和/或包括鱼鳍在内的河鲀鱼骨制备的。
4. 一种用河鲀鱼皮和/或包括鱼鳍在内的河鲀鱼骨制备河鲀 I 型胶原蛋白提取物的方法，它包括以下步骤：

(1) 原料预处理：

- a. 天然河鲀鱼皮、鱼骨原料的脱毒预处理：在 0℃ ~ 50℃，用酸液或碱液处理 4 小时 ~ 48 小时，充分水洗，如此重复 4 至 6

次；

使用碱液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，碱液终浓度为 $0.01\sim0.1\text{ mol/L}$ ， $20^\circ\text{C}\sim30^\circ\text{C}$ ，脱毒8小时~24小时，重复4~5次；使用酸液脱毒时，较为优选的工艺条件是常压，酸液终浓度为 $0.1\sim0.2\text{ mol/L}$ ， $0^\circ\text{C}\sim20^\circ\text{C}$ ，脱毒6小时~24小时，重复4~5次；

b. 用水将人工繁育淡水饲养的河鲀鱼皮、鱼骨原料或脱毒后的天然河鲀鱼皮、鱼骨原料洗净，如暂时不用，可于 $-20^\circ\text{C}$ 以下长期冷冻保存备用；

(2) 提取，按下列三种提取方法之一进行：

a. 向预处理后的河鲀鱼皮、鱼骨为任意比例的原料中加入水或酸液，在 $0^\circ\text{C}\sim125^\circ\text{C}$ ，常压~3个大气压下，提取60分钟~100小时，滤取液态部分，如此重复0~6次，合并滤液，将残渣加水或与滤液合并粉碎匀浆得匀浆液，以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在 $20^\circ\text{C}$ 以下放置12~48小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压， $0^\circ\text{C}\sim10^\circ\text{C}$ ，酸液反应终浓度范围是 $0.1\sim0.5\text{ mol/L}$ ，提取48~72小时，重复2~4次，匀浆；以及常压， $40^\circ\text{C}\sim80^\circ\text{C}$ ，酸液反应终浓度范围是 $0.01\sim0.2\text{ mol/L}$ ，提取4小时~8小时，重复3~5次，匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压， $90^\circ\text{C}\sim100^\circ\text{C}$ ，提取3小时~8小时，重复1~3次，匀浆；

b. 向预处理后的河鲀鱼骨原料加入水或酸液，在 $0^\circ\text{C}\sim125^\circ\text{C}$ ，常压~3个大气压下，提取60分钟~100小时，滤取液态部分，如此重复0~6次，合并滤液，弃去残渣，将滤液浓缩至原体

积的 100%~10% 后，加入适量河鲀鱼皮原料，在 0℃~125℃，常压至 3 个大气压下，提取 60 分钟~100 小时，滤取液态部分，再加水或同样的酸液提取，如此重复 0~6 次，合并滤液，将残渣与滤液合并后粉碎匀浆得匀浆液。以酸液为提取溶剂获得的匀浆液继续在 20℃以下放置 12~48 小时；以水为提取溶剂获得的匀浆液则直接进入下一步工序；

其中使用酸液提取时，较为优选的工艺条件是常压，0℃~10℃，酸液反应终浓度范围是 0.1~0.5 mol/L，提取 48~72 小时，重复 2~4 次，匀浆；以及常压，40℃~80℃，酸液反应终浓度范围是 0.01~0.2 mol/L，提取 4 小时~8 小时，重复 3~5 次，匀浆；

其中使用水提取时，较为优选的工艺条件是常压，90℃~100℃，提取 3 小时~8 小时，重复 1~3 次，匀浆；

c. 也可以按现有 I 型胶原蛋白和明胶常规提取方法或修改的方法制备获得本发明的河鲀 I 型胶原蛋白提取物；

### (3) 过滤浓缩：

匀浆液经离心或过滤去渣，可选择地，将滤液进行浓缩，可浓缩至原体积的 100%~10%，得河鲀 I 型胶原蛋白提取物浓缩液；

其中使用酸液低温提取时，较为优选的去渣方法是低温高速离心；使用水或酸液高温提取时，较为优选的去渣方法是过滤；

使用酸液低温提取时，较为优选的浓缩方法是应用 100~200Kda 孔径超滤膜超滤浓缩；使用水或酸液高温提取时，较为优选的浓缩方法是减压真空浓缩；

优选的简便制备方法是在上述提取液离心或过滤去渣后，直接进行（超滤）浓缩、（冷冻、喷雾）干燥获得河鲀 I 型胶原蛋

白提取物；

(4) 可选择地，进行干燥粉碎：

将提取物或其浓缩液经干燥（可选择喷雾干燥、冷冻干燥，或者微波干燥、烘干、阴干，优选冷冻干燥或喷雾干燥）后粉碎至 80 目以上，得淡黄色或白色粉状产品——河鮋 I 型胶原蛋白提取物；

其中，所用的酸液为有机酸或无机酸液，碱液为无机碱液，提取时的终浓度为 0.001 ~ 1.0 mol/L，脱毒时的终浓度为 0.01 ~ 0.5 mol/L；可以所采用的酸是例如：甲酸，乙酸，丙酸，丙二酸，丁酸，丁二酸，苹果酸，枸橼酸，酒石酸，乳酸，磷酸，盐酸，硫酸，硝酸；所采用的碱是例如：氢氧化钠，氢氧化钾，氢氧化钙（石灰水），碳酸钠；所采用的酶是例如：胰蛋白酶，胰酶，胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，胰凝乳蛋白酶，菠萝蛋白酶、中性蛋白酶，链霉蛋白酶，凝血酶，明胶酶，Ⅱ型胶原酶，Ⅲ型胶原酶，蛋白酶 K 及其它动植物和微生物来源的各种蛋白水解酶。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其特征是在过滤浓缩步骤后还可按下述两种方法之一进行控制性部分水解处理：

(1) 蛋白水解酶水解，条件：反应体系中的蛋白水解酶浓度为 1 ~ 100 mg/100g 湿重组组织，优选 10 ~ 50 mg 酶/100 g 湿重组组织，搅拌，温度为 20°C ~ 65 °C，优选温度为 30°C ~ 37°C，时间为 3 小时 ~ 100 小时，优选 3 小时至 48 小时，酶解结束后，100°C 加热 5 ~ 10 分钟终止酶活力；

(2) 有机酸和/或无机酸水解，条件：反应体系中的酸浓度为 0.001 mol/L ~ 1.0 mol/L，优选 0.05 ~ 0.50 mol/L，搅拌，温度为 0°C ~ 100 °C，优选 25°C ~ 75°C，时间为 60 分钟 ~ 72 小时后，优选 3 小时 ~ 24 小时，中和或减压脱酸；

可选择的，再将水解液浓缩，可浓缩至原体积的 100%~10%，将水解浓缩液干燥即得，或进行沉淀处理，干燥即得河鮀 I 型胶原蛋白提取物。

其中，可使用的酸或酶同权利要求 4 的酸和酶。优选的酶是 III型胶原酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶；优选的酸是乙酸和盐酸。

6. 根据权利要求 4 所述的方法，其特征是在浓缩步骤后还可按下述两种方法之一进行沉淀处理：

(1) 向提取浓缩液中加入其 8~15 倍体积量的冷丙酮，优选 10~12 倍体积量，在 10℃以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，干燥得河鮀 I 型胶原蛋白提取物；

(2) 向提取浓缩液中加入冷乙醇至终浓度为 55~90%，优选 75~90%，在 10℃以下沉淀 24~48 小时，离心或滤取沉淀，沉淀挥除残余有机溶剂，可选择的，干燥得到河鮀 I 型胶原蛋白提取物；

7. 根据权利要求 6 所述的方法，其特征是将所得沉淀用含 1.0~2.2mol/L 氯化钠的中性缓冲液 (pH7.5) 或直接用 1.0~2.2 mol/L 氯化钠溶液反复抽提，抽提液脱盐，可选择的进行干燥，得较高纯度河鮀 I 型胶原蛋白提取物；

8. 根据权利要求 4~7 任何一项的方法，其中将权利要求 4 步骤 (3) 所得浓缩液、权利要求 5 所得水解液、权利要求 6 所得沉淀的稀酸复溶液和权利要求 7 所得抽提液，经中和、过滤和脱盐后，用 DEAE- 和 / 或 CM- 离子交换法纯化，除去杂蛋白，离子交换洗脱液脱盐后干燥，即得高纯度河鮀 I 型胶原蛋白提取物。

9. 按照权利要求 4~8 任何一项的方法制备的河鮀 I 型胶原蛋白提取物。

10. 根据权利要求 9 的河鮀 I 型胶原蛋白提取物，其特征在

于所述河鮀 I 型胶原蛋白提取物主要化学成分和药理学活性成分是天然未变性河鮀 I 型胶原蛋白或其变性 I 型胶原蛋白及其部分水解物，河鮀 I 型胶原蛋白提取物特征如下：

- a) 河鮀 I 型胶原蛋白提取物是以河鮀鱼皮和/或河鮀鱼骨(鳍)为原料制备的，以河鮀 I 型胶原蛋白或其变性 I 型胶原蛋白及其部分水解产物为主要化学成分和药理学活性成分，并具有典型的(鱼类) I 型胶原蛋白理化性质；
- b) 河鮀 I 型胶原蛋白提取物的 I 型胶原蛋白或其变性 I 型胶原蛋白及其部分水解物的含量大于 50%，总蛋白含量大于 70%；
- c) 河鮀 I 型胶原蛋白三聚体 [ $\alpha_1(I)$ ]<sub>2</sub> $\alpha_2(I)$  分子量范围为 300~420 KDa，河鮀变性 I 型胶原蛋白[包括  $\alpha_1(I)$  单体、 $\alpha_2(I)$  单体、 $\alpha_1(I)$  二聚体和  $\alpha_1(I)\alpha_2(I)$  二聚体]及其部分水解物分子量范围为 60~300KDa；等电聚焦法测得河鮀 I 型胶原蛋白两个亚基的等电点分别为  $\alpha_1(I)$ :  $4.85 \pm 0.5$  和  $\alpha_2(I)$ :  $6.71 \pm 0.5$ (图 1)，但是河鮀 I 型胶原蛋白两个亚基的等电点可随河鮀品种的不同而有差异；
- d) 经 Perkin Elmer Lambda 2 UV-Vis Spectrometer 紫外吸收扫描显示，以 0.2mol/L 醋酸为溶剂的 0.3mg/ml 河鮀 I 型胶原蛋白提取物溶液的紫外吸收最大波长为  $226 \pm 3$  nm，以 0.1mol/L 盐酸为溶剂的 0.1mg/ml 河鮀 I 型胶原蛋白提取物溶液的紫外吸收最大波长为  $203 \pm 3$  nm；河鮀 I 型胶原蛋白提取物溶液在 260~280nm 波长处无吸收峰且吸收值较小(图 3)；
- e) 经 Kivirikko 法与氨基酸自动分析仪测定，河鮀 I 型胶原蛋白提取物羟脯氨酸重量百分比含量大于 4.5%，类似于其它鱼类胶原蛋白，鱼类胶原蛋白羟脯氨酸重量百分比一般低于 10%，显著低于陆地动物 I 型胶原蛋白的羟脯氨酸含量(14%)；权利要求

4 至 8 中任意一项所述的方法所得到的河鲀 I 型胶原蛋白提取物的氨基酸组成可如表 1 ~ 表 3 和表 5 所示；河鲀 I 型胶原蛋白提取物是糖蛋白，其蛋白结合糖的含量为 0.5% ~ 1.9%；应该理解，样品测定数据之间的差异是由于河鲀品种不同、提取原料的不同和提取工艺条件的差异造成产物纯度有所不同等因素引起，但它们均是以河鲀 I 型胶原蛋白作为主要化学成分与药理学活性成分为基础而测得；

f) 河鲀 I 型胶原蛋白提取物可溶于水和稀酸溶液，其水溶液对热稳定，在 95°C ~ 100°C 加热数小时，仍可保持药理学与生物学活性不变；河鲀 I 型胶原蛋白提取物的弱酸稀溶液（小于 0.5mol/L）于 -20°C ~ 室温长期放置，药理学与生物学活性可基本保持稳定不变；但是，河鲀 I 型胶原蛋白提取物对碱非常敏感，在低浓度的弱碱溶液中，即使室温放置数小时，其药理学与生物学活性可完全丧失；河鲀 I 型胶原蛋白提取物对 III 型胶原酶不敏感，对 I 型胶原酶敏感，经 I 型胶原酶短时间水解处理，河鲀 I 型胶原蛋白提取物的药理学与生物学活性迅速下降。

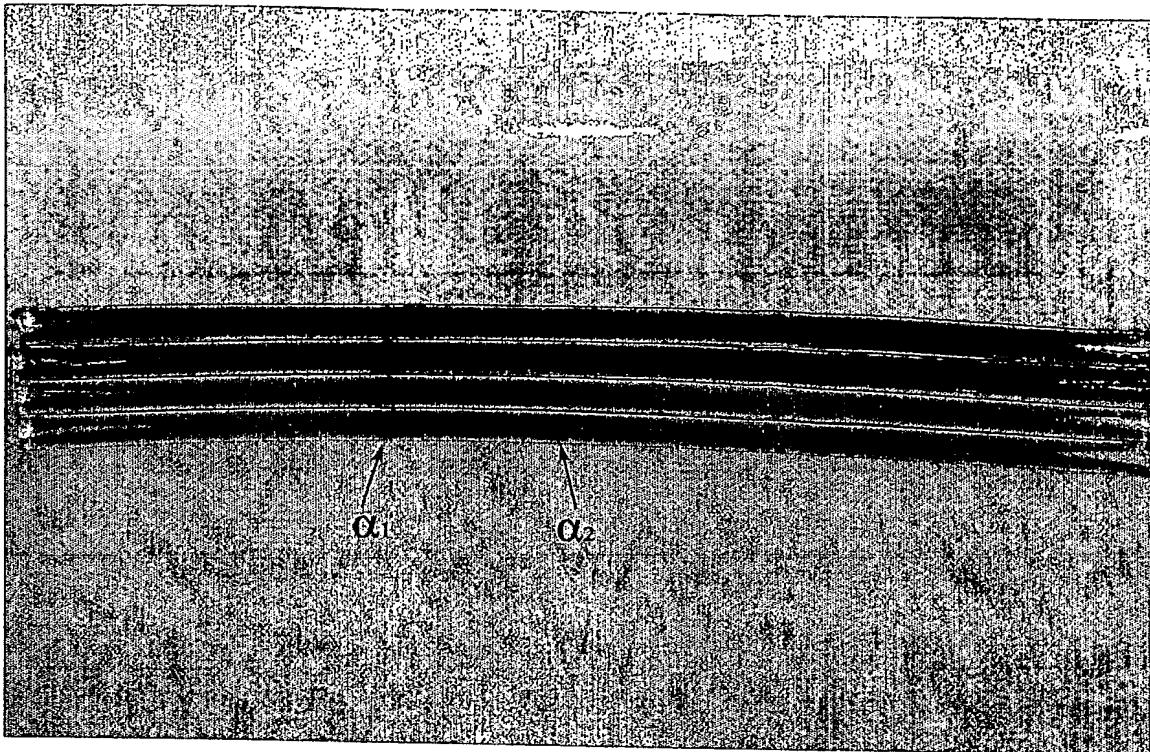


Fig. 1

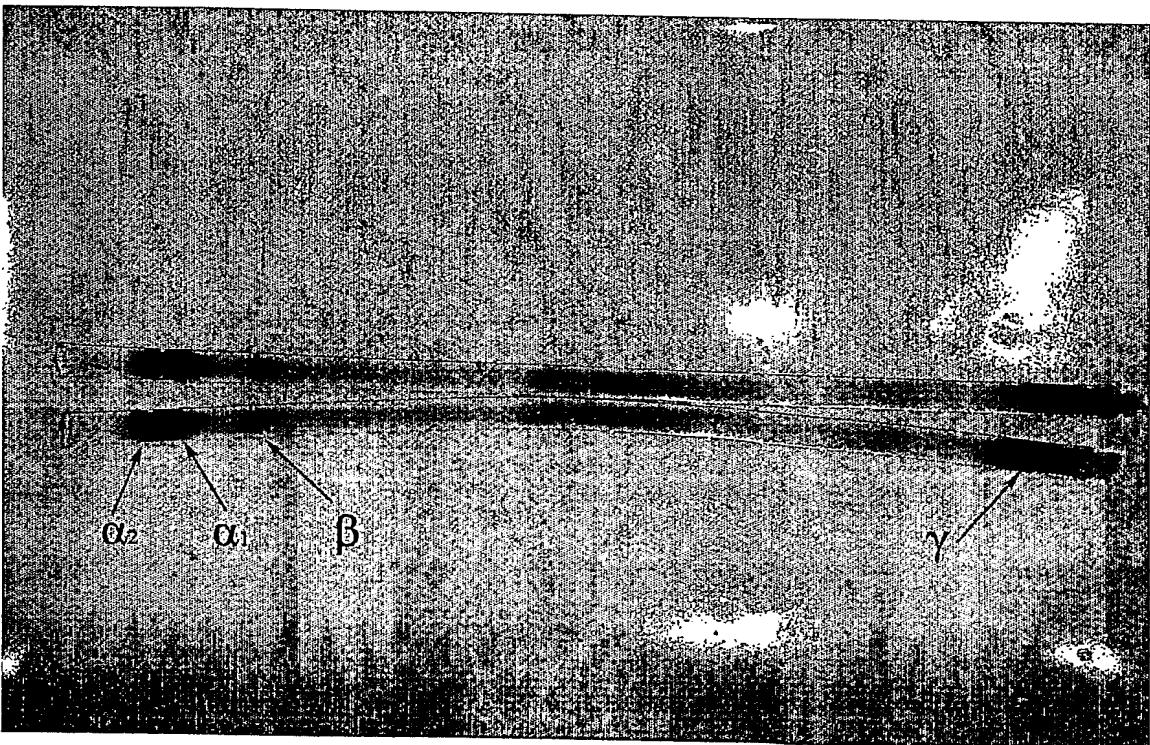


Fig. 2

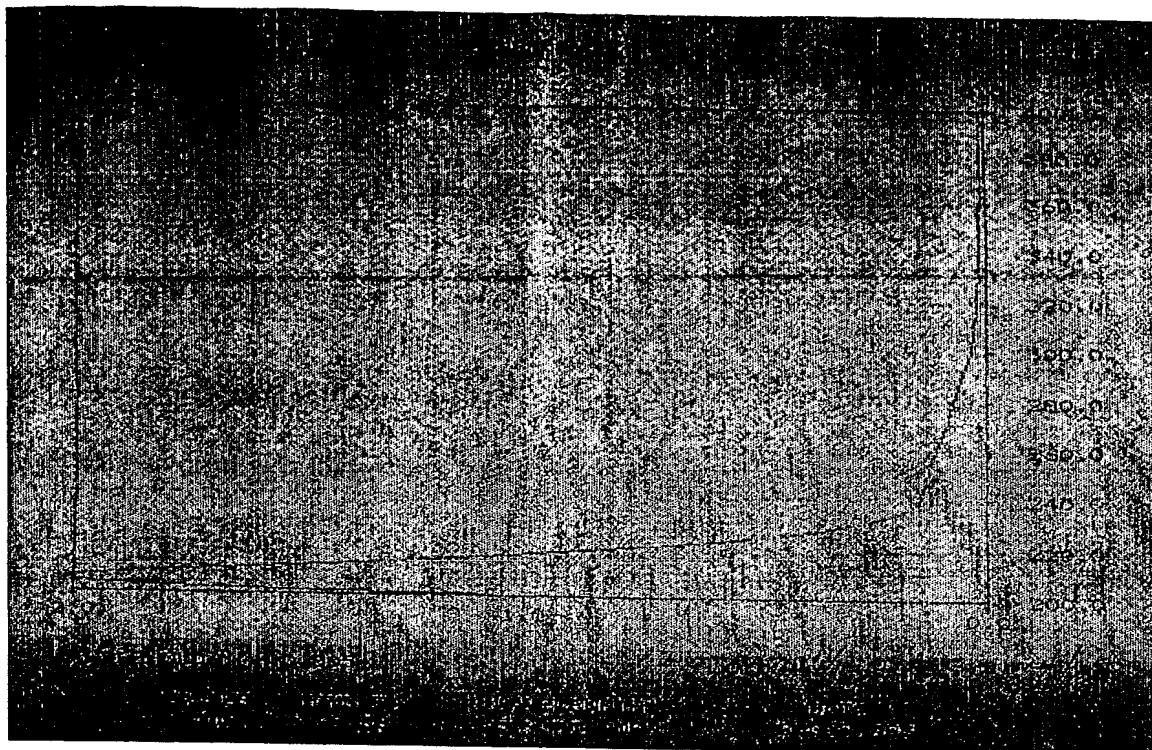


Fig. 3

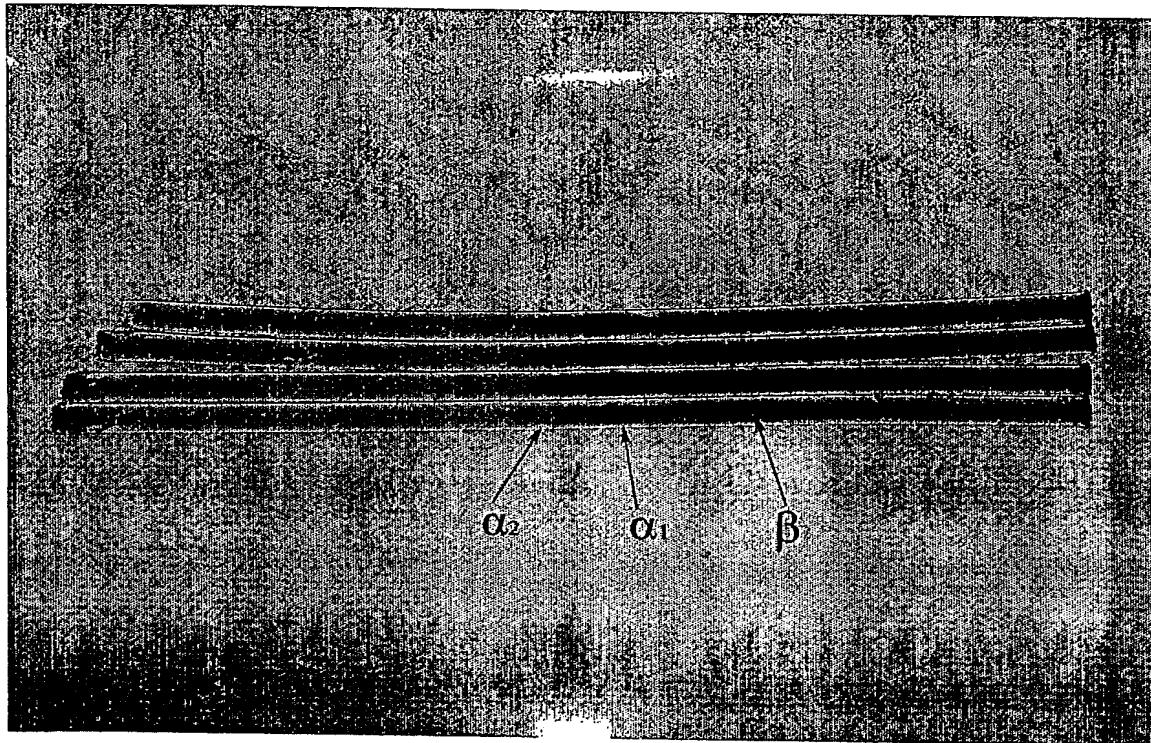


Fig. 4

BEST AVAILABLE COPY

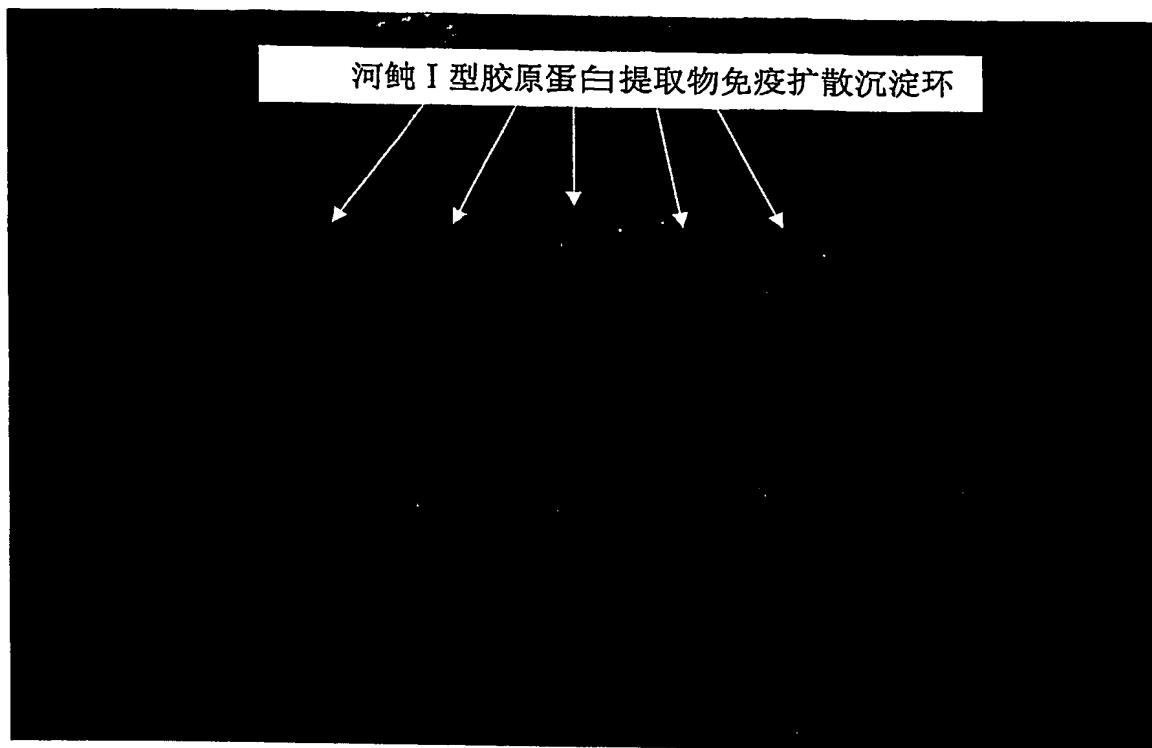


Fig. 5

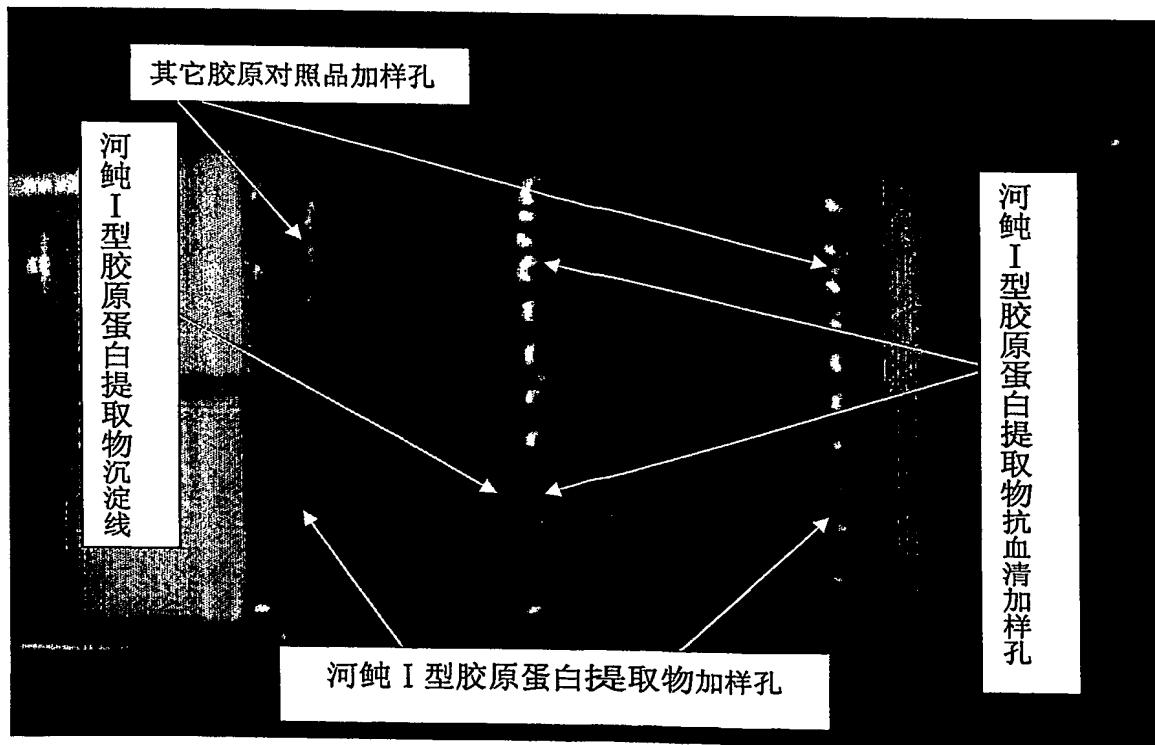


Fig. 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000996

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 A61K 35/60 A61P 1/00 A61P17/00 A61P 19/02 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 A61K 35/60 A61P 1/00 A61P17/00 A61P 19/02 A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC (globefish disease collagen swellfish 河豚 胶原蛋白 疾病 )

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN, C, 1116880(HONGYU PHARM CO LTD LIAOYANG) 06.AUG 2003(06.08.2003) all the document	1-10
A	JP, A, 8283665 (KITA-N) 29. OCT 1996 (29.10.1996) abstract	1-10
A	KR, A, 2001074322 (CHOM-I)04.AUG 2001 (04.08.2001) abstract	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 20. DEC 2004 (20.12.2004)	Date of mailing of the international search report 03 · MAR 2005 (03 · 03 · 2005)
Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 10100088 Beijing, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer LILAN Telephone No. (86-10)62085067

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

BEST AVAILABLE COPY

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000996

**A. 主题的分类**IPC<sup>7</sup> A61K 35/60 A61P 1/00 A61P17/00 A61P 19/02 A61P35/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC<sup>7</sup> A61K 35/60 A61P 1/00 A61P17/00 A61P 19/02 A61P35/00

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

CNKI

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT WPI EPODOC (globefish disease collagen swellfish 河豚 胶原蛋白 疾病 )

**C. 相关文件**

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN, C, 1116880 (辽阳鸿宇制药有限公司) 6. 8 月 2003 (06.08.2003) 全文	1-10
A	JP, A, 8283665 (KITA-N) 29.10 月 1996 (29.10.1996) 摘要	1-10
A	KR, A, 2001074322 (CHOM-I) 4. 8 月 2001 (04.08.2001) 摘要	1-10

 其余文件在 C 栏的续页中列出。 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇

引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

20.12月 2004 (20.12.2004)

国际检索报告邮寄日期

0 3 · 3 月 2005 (0 3 · 0 3 · 2 0 0 5)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

李岚



电话号码: (86-10)62085067